Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik,
Bereich Stoffwechsel,
im Klinikum Charlottenburg der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Meta Alexander

DIE ANREICHERUNG UND METABOLISIERUNG VON DIGOXIN IN DER NEBENNIERE DER RATTE UNTER VERSCHIEDENEN ENDOKRINEN BEDINGUNGEN

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Michael Oeff
aus Berlin-West

1977

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik,
Bereich Stoffwechsel,
im Klinikum Charlottenburg der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Meta Alexander

DIE ANREICHERUNG UND METABOLISIERUNG VON DIGOXIN IN DER NEBENNIERE DER RATTE UNTER VERSCHIEDENEN ENDOKRINEN BEDINGUNGEN

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Michael Oeff
aus Berlin-West

Referent : Prof. Dr. A. Ruiz-Torres

Korreferent : Prof. Dr. N. Rietbrock

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am 6. 6. 1977

Meinem Lehrer und Doktorvater
Herrn Prof. Dr. A. Ruiz-Torres
danke ich für die Überlassung des Themas
und die Unterstützung bei der Durchführung
der Arbeit.

M. Oeff

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549607_0027

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. Einleitung 5

2. Zur Wechselwirkung zwischen Digitalis und Nebennierenrindenhormonen und deren Regelmechanismen (Literaturübersicht) 6

2.1. Anreicherung von Digitalis in der Nebenniere 6

2.2. Morphologische Veränderungen der Nebenniere unter Digitalis-Gabe 9

2.3. Wechselwirkung zwischen Digitalis und Glukokortikoid-Synthese und -Sekretion 1o

2.4. Wechselwirkung zwischen Digitalis und Mineralokortikoid- Synthese und - Sekretion 13

2.5. Wechselwirkung zwischen Digitalis und Mineralokortikoiden am Zielorgan 16

3. Material und Methodik 18

3.1. Tiermaterial, Hypophysektomie 18

3.2. Angewandte Substanzen, Reinheitsgrad und Applikationsart 19

3.3. Organgewinnung 22

3.4. Auflösung der Organe 22

3.5. Messung der Radioaktivität 23

3.6. Extraktion von Digoxin aus dem Gewebe 24

3.7. Dünnschichtchromatographie 25

3.8. Überprüfung von Glykosid-Bestimmungsmethoden 27

3.8.1. Xanthydrol-Reaktion 27

3.8.2. Radioimmunoassay 28

3.9. Statistik und Berechnungen 29

Seite

4. Ergebnisse 3o

4.1. Affinität von Digoxin zur Nebenniere der Ratte 3o

4.1.1. beim normalen Tier 3o

4.1.2. nach ACTH 33

4.1.3. nach Hypophysektomie 34

4.1.4. nach Metyrapon 35

4.2. Metabolisierung von Digoxin in der Nebenniere 37

4.3. Affinität von Digoxigenin zur Nebenniere 38

5. Diskussion 38

6. Zusammenfassung 47

7. Literaturverzeichnis 48

8. Lebenslauf 59

1. Einleitung

Herzwirksame Glykoside werden in den Nebennieren bestimmter Versuchstiere in einer Weise konzentriert, die eine spezifische Anreicherung vermuten läßt. Die strukturelle Verwandtschaft der herzwirksamen Glykoside mit den in diesem Organ gebildeten Steroidhormonen unterstreicht diese Deutung. Auch klinische Beobachtungen über endokrine Nebenwirkungen könnten darauf zurückzuführen sein. Neben der wiederholten Bestätigung der von REPKE 1958 erbrachten Ergebnisse, die diese Anreicherung dokumentieren, liegen kaum darüber hinausgehende Beobachtungen vor.

Im Folgenden wird untersucht, ob die festgestellte Anreicherung tatsächlich dem spezifischen Prozess der aktiven Aufnahme entspricht und dem hormonellen Regelkreis Hypophyse-Nebenniere unterliegt.

Ferner soll geprüft werden, inwieweit das aufgenommene Glykosid in der Nebenniere metabolisiert wird. Die Ergebnisse sollen abschließend insbesondere unter dem Gesichtspunkt besprochen werden, inwiefern sie die Annahme bekräftigen, daß die in-vivo-Verabfolgung von Herzglykosiden die Biosynthese von Kortikosteroiden beeinflusst.

2. Zur Wechselwirkung zwischen Digitalis und Nebennierenrindenhormonen und deren Regelmechanismen (Literaturübersicht)

2.1. Anreicherung von Digitalis in der Nebenniere

Eine spezifische Anreicherung von Digitalis in der Nebenniere wurde zuerst von REPKE (1958) bei Ratten beobachtet: Unmittelbar nach der Injektion von Digitoxin wurde eine Konzentration von 85.3 µg Digitoxin / g Gewebe in der Nebenniere gemessen. Dieser Wert lag weit vor dem der Leber (28.4 µg/g), der Nieren (16.4), des Herzens (11.7) und der Skelettmuskulatur (2.9). Bis zu einer Konzentration von 8o µg/g Nebennierengewebe reicherten sich auch andere Glykoside wie Lanatosid C, Ouabain und Proscillaridin A an und erreichten damit Konzentrationen, die bis zu 2o-fach höher waren als in der Skelettmuskulatur (BUCHTELA et al. 197o). Nach CASTLE und LAGE (1973) erreichte die Digitoxin-Konzentration der Nebenniere sogar das 9o-fache der des Myokards und ein Vielfaches der von Leber und Niere (s.a. Übersicht von RUIZ-TORRES 197o). DUTTA und MARKS (1966) fanden 6 Stunden nach der i.v.-Injektion von Digoxin-H^3 bei Ratten eine Konzentration in der Nebenniere, die 15 mal höher lag als in anderen Geweben.

In vergleichenden Untersuchungen ist es in jedem Fall das Digitoxin, das von allen Digitalis-Glykosiden am stärksten in der Nebenniere der Ratte konzentriert wird (DUTTA und MARKS 1966, BUCHTELA et. al. 197o).

Nicht so eindeutig sind dagegen die Befunde bei den Spezies, die hinsichtlich der Ausscheidung andere kinetische Daten aufweisen.

α-Acetyldigoxin wird bei Hunden am stärksten in der Niere als gut durchblutetes Eliminationsorgan konzentriert (2.98 µg/g), an zweiter Stelle in der Nebenniere (1.31),

dann im Myokard (1.02), in der Leber (0.76) und im Skelettmuskel (0.59) . Das Maximum erscheint 5-10 Minuten post injektionem (KRAUPP et al. 1968).

DOHERTY und Mitarbeiter fanden 8-12 Stunden nach Digoxin-H^3-Gabe beim Hund die höchsten Konzentrationen in der Niere und im Myokard, an dritter Stelle erst in der Nebenniere (DOHERTY und PERKINS 1966b) bzw. nach dem Pankreas an vierter Stelle (DOHERTY und PERKINS 1966a, DOHERTY 1968). Beim Menschen ist die absteigende Reihenfolge der Gewebe-Serum-Quotienten des Digoxin-H^3 Niere > Herz > Nebenniere = Pankreas. Es wird also keine besondere Anreicherung beobachtet (OKITA 1957, DOHERTY et al. 1967, DOHERTY 1968).

Autoradiographische Untersuchungen (BRETSCHNEIDER et al. 1962) haben ergeben, daß C^{14}-markiertes Lanatosid C in ganz typischer Weise überwiegend in der Rinde der Nebenniere gespeichert wird: Eine starke Radioaktivität findet sich in den Zellballen der zona glomerulosa; in der äußeren Schicht der zona fasciculata ist die Radioaktivität geringer; die mittlere und innere Zone der fasciculata ist weitgehend frei davon. An der Grenze der zona reticularis zum Mark tritt wieder eine stärkere Imprägnierung auf.

Im zeitlichen Ablauf steigt bei der Ratte nach Digitoxin-Gabe der Gewebe-Serum-Quotient der Nebenniere innerhalb von 12 Stunden von 11.8 um das Doppelte auf 23.8 an und liegt damit eine Zehnerpotenz höher als der des Myokards (REPKE 1958). Im Gegensatz dazu zeigen die Gewebe-Serum-Quotienten anderer Gewebe eine konstante, "charakteristische" (REPKE) Größe. Für α-Acetyl-digoxin wird eine Halbwertszeit in der Nebenniere des Hundes unter Berücksichtigung der ersten 2 Stunden post injektionem von $1^h\ 44^{min}$ errechnet. Dabei ändert sich der Gewebe-Serum-Quotient nicht (KRAUPP et al. 1968).

Die Metabolisierung von Digitalis in der Nebenniere ist nicht nennenswert. Metaboliten von Digitoxin-H^3 konnte 18^h p.i. in der Nebenniere von Ratten ebenso wie im Blut so gut wie nicht entdeckt werden, während in anderen Organen das Digitoxigenin-bis-digitoxosid überwog. Der größte Teil der in Blut und Nebennieren wiedergewonnenen Radioaktivität bestand aus Digitoxin-H^3. Ein sehr geringer Teil wurde als Digitoxigenin-bis-digitoxosid (3% der Gesamtaktivität in der Nebenniere) und Digoxigenin (o.34%) identifiziert (CASTLE und LAGE 1973). KRAUPP et al. (1968) fanden bei der fluorometrischen Bestimmung 4-6 Stunden nach α-Acetyldigoxin in der Hundeniere im Gegensatz zu anderen Organen keinen Wiederanstieg der Meßwerte. Dieser Wiederanstieg soll eine falsch positive Reaktion auf Abbauprodukte des Digoxin sein. Daher wurde geschlossen, daß solche Abbauprodukte in der Nebenniere nicht auftreten.
Auch OKITA et al. (1955) untersuchten bei Menschen das Verhältnis Metaboliten zu Digitoxin 16-36 Stunden nach Digitoxin-C^{14}-Applikation. Dabei fanden sie in der Nebenniere einen Quotienten (Metaboliten/Digitoxin), der mit 2.5 unter dem des Blutes (4.o) lag und um vieles niedriger ist als z.B. der der Leber (9.o). PROPPE (1974) untersuchte die Kinetik von H^3-digoxigenin-mono-digitoxosid im Meerschwein und errechnete mit einem H_2O:$CHCl_3$-Verhältnis ein relatives Überwiegen hydrophober Substanzen u.a. in der Nebenniere (1.5) im Gegensatz zu Leber und Galle (3o.o) und Niere und Urin (5.o).

Der Mechanismus der spezifischen Anreicherung von Digitalis in der Nebenniere ist noch nicht eindeutig geklärt. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit dem sowohl dem Digitalis als auch den Kortikosteroiden gemeinsamen Cyclopentanoperhydrophenanthren-Gerüst wird ein Um- oder Ein-

bau bei der Synthese in der Nebenniere vermutet (DOHERTY et al. 197o, RUIZ-TORRES 197o, CASTLE und LAGE 1973). . Nach den o.g. Ergebnissen ist jedoch keine diesbezügliche Metabolisierung von Digitalis in der Nebenniere nachgewiesen worden. Zudem wurde in anderen steroidhormonproduzierenden Organen wie Hoden und Ovar keine ähnliche Anreicherung festgestellt (REPKE 1958). Außerdem ist eine Nebennieren-Anreicherung auch bei Substanzen festgestellt worden, die keinerlei chemische Ähnlichkeiten mit den Steroidhormonen besitzen, so z.B. das p-Acetamino-benzaldehyd-thiosemicarbazon ("Conteben") (HINRICHS et al. 1954) und Chlorphenothan (DDT) (BERNDT 1966), letzteres wohl wegen der guten Lipoidlöslichkeit.

Doch auch der Lipoidgehalt der Nebenniere ist offensichtlich nicht der bestimmende Faktor für die Akkumulation, denn die zona fasciculata, die als besonders lipoidreich gilt, speichert nach den Befunden von BRETSCHNEIDER et al. (1962) weniger Glykoside als die zona glomerulosa.

2.2. Morphologische Veränderungen der Nebenniere unter Digitalis-Gabe

Bei Langzeit-Digitalis-Applikation treten morphologische Veränderungen an der Nebennierenrinde auf. So kommt es zu einer Gewichtszunahme der Nebenniere (von METZLER 1949, 1952, PYÖRÄLÄ 1958, SZALAY 1971, INABA und KAMATA 1972), die bei täglicher Subcutan- Applikation von 1.o-1.5 mg Ouabain pro kg/Körpergewicht schon nach 5 Tagen signifikant ist. Der Quotient Nebennierengewicht: Körpergewicht zeigt ab 5. Tag, unabhängig von der Dauer der Applikation, eine klare Dosisabhängigkeit (GOMOLL 1967). Diese Gewichtszunahme beruht im wesentlichen auf einer Verbreiterung der zona glomerulosa durch Zellhyperplasie und -hypertrophie, deren Lipidgehalt und

-verteilung auch deutlich im Sinne eines gesteigerten Stoffwechsels verändert ist (DEANE und GARDNER 1951, GARDNER et al. 1954, HARTROFT und EISENSTEIN 1957, GOMOLL 1967). Die zona fasciculata und die zona reticularis zeigten histologisch keine Veränderungen, was für einen intakten Regelkreis Hypophyse-Nebenniere spricht (GOMOLL 1967). Die Verschmälerung der zona fasciculata bei starker Hyperplasie der zona glomerulosa wird als Druckatrophie gedeutet (HARTROFT und EISENSTEIN 1957). Eine direkte Wirkung des Digitalis auf die Nebenniere ohne Einbeziehung des hormonellen Regelkreises ist offensichtlich auch vorhanden, denn auch nach Hypophysektomie wurde eine Nebennierenhypertrophie beobachtet (von METZLER und GREEFF 1954).
Allerdings wurde auch bei Langzeit-Digitoxin-Applikation (5 mg/kg Körpergewicht, 35^{d}) eine signifikante Abnahme des Nebennierengewichts beobachtet (VERNIKOS-DANELLIS und MARKS 1962), jedoch zeigten auch in diesem Versuch Tiere mit zentral-nervösen Intoxikationssymptomatik eine Nebennierenhypertrophie.

2.3. Wechselwirkung zwischen Digitalis und Glukokortikoid-Synthese und -Sekretion

Die Langzeit-Digitalis-Applikation beeinflusst die Glukokortikoid-Konzentration sowohl des Serums als auch des Nebennierengewebes. Ouabain oder Digitoxin (1-3mg/kg Körpergewicht·die über 6-15 Tage) rufen in vivo bei Ratten eine Steigerung der Corticosteron- und der Cortisol-Produktion bei gleichzeitigem Abfall des Corticosteron-Gehaltes der Nebennieren hervor (NAKAGAWA und WATANABE 1966, DENTON et al. 1969, INABA und KAMATA 1972, BLAINE et al. 1974).

Für eine ursächliche Beteiligung des hypothalamisch-hypophysären Systems an diesem Effekt spricht, daß die bei Intoxikation und zentraler Erregung besonders starke Erhöhung der Corticosteron-Produktion durch Narkotika und Dexametason zu unterdrücken ist (NAKAGAWA und WATANABE 1966). Aufgrund dieser Ergebnisse werden die Thesen aufgestellt, daß Ouabain primär zu einer CRF-Sekretion durch Elektrolytverschiebung im ZNS (BLAINE et al. 1974) oder durch zentrale Erregung (NAKAGAWA und WATANABE 1966) führt.

Jedoch bei SZALAY (1971) war eine Dosis von 1.5 mg Ouabain /kg Körpergewicht·die subcutan über 14 Tage nicht ausreichend, um eine Veränderung des Glukokortikoid-Gehaltes der Nebennieren zu bewirken. GOMOLL und SHERROD (1964) konnten ebenfalls mit einer kurzdauernden Infusion von Acetylstrophanthidin (insgesamt 1.2 mg) keinen Einfluß auf die Sekretionsrate von Corticosteron und Hydrocortison feststellen.

Es ist aber auch ein direkter Einfluss von Digitalis auf die Nebennieren zu vermuten, da bei längerer Applikation (3 mg Ouabain/kg KGew·die, 15^{d}, subcutan) auch bei hypophysektomierten Ratten ein Ansteigen der Corticosteron-Konzentration im Serum zu verzeichnen ist. Dabei fällt gleichzeitig der Corticosteron-Gehalt in der Nebenniere ab (INABA und KAMATA 1972).
Ebenso untersuchten dieselben Autoren 1975 die Wirkung von exogenem ACTH und Adrenalin auf die Nebennieren von Ratten, die die Langzeit-Ouabain -Behandlung erhalten hatten. Sowohl bei normalen als auch bei hypophysektomierten Tieren wurde die durch diese Substanzen hervorgerufene Corticosteron-Synthese vermindert oder gehemmt, wobei eine Abhängigkeit von der Häufigkeit der Ouabain-Applikation bestand. Die Autoren führen dies auf eine funktionelle Änderung der

Nebenniere zurück. Auch VERNIKOS-DANELLIS und MARKS (1962) konnten zeigen, daß Langzeit-Digitoxin-Gaben (5 mg /kg KGew·Tag, subcutan, 35^d) die Vermehrung einer streßinduzierten Synthese der Corticosteroide unterdrücken können.

Jedoch wird bei in-vitro-Untersuchungen, bei denen die komplexen Regelmechanismen der Kortikosteroid-Synthese durch nur wenige Variable ersetzt sind, eine hemmende Wirkung des Ouabain auf die Glukokortikoid-Synthese beobachtet, die abhängig ist von Dosis und Dauer der Applikation dieser Substanz (GOMOLL 1967 WELLEN und BENRAAD 1969b). Die Beobachtung, daß bei einer Ouabain-Konzentration von $1o^{-7}$ M der Kationentransport im gleichen Umfang gehemmt ist wie die Corticosteron-Biosynthese (WELLEN und BENRAAD 1969b) und ein hemmender Einfluss von Ouabain nur dann auftritt, wenn die Stimulierung der Biosynthese durch K-Ionen erfolgt, läßt eine Interferenz zwischen K-Ionen und Ouabain an Rezeptoren vermuten, die an der äußeren Zellmembran zu liegen scheinen und die Biosynthese anregen (WELLEN und BENRAAD 1971). Diese Minderung der Kortikosteroid-Sekretion wird auf eine Hemmung der Aktivität der Na-K-aktivierten Membran-ATPase durch Digitalis zurückgeführt (WELLEN und BENRAAD 1969a).
Demgegenüber fanden BOYD et al. (1973) bei einer Stimulation der Corticosteron-Sekretion mit ACTH und cAMP keine wesentliche Beeinflussung durch den Zusatz von Ouabain ($5x1o^{-4}$M).

Die Beobachtung, daß die 14-tägige Vorbehandlung der Ratten mit Ouabain die in-vitro-Bildung von Corticosteron durch ACTH verstärkt, deutet nach GOMOLL (1967) auf eine direkte Digitaliswirkung auf molekularer Ebene oder auf eine durch dieses Pharmakon hervorgerufene höhere Empfindlichkeit der Nebennieren auf trophische Einflüsse. Eine verstärkte Ausschüttung lag nicht vor, da der Corticosteron-Gehalt der Nebennieren sich durch

die Digitalis-Gaben nicht änderte. Man muß jedoch dabei berücksichtigen, daß die in-vitro-Produktion von Nebennierenrindensteroiden vom Ausmaß der adrenalen Stimulation durch ACTH in vivo abhängig zu sein scheint (MARGOULIES et al. 1972).

Es wird aber auch von steigender Steroid-Produktion in Mäuse-Nebennieren in vitro berichtet (BARTOVA und BIRMINGHAM 1971), die ein Maximum bei einer Ouabain-Konzentration von $1o^{-4}$M hat. Bei einer geringeren ($1o^{-5}$M) oder höheren ($1o^{-3}$M) Konzentration des Digitalis zeigt sich keine Beeinflussung der in-vitro-Synthese. Unter denselben Bedingungen konnte mit Ratten-Nebennieren bei einer Konzentration von $1o^{-3}$M Ouabain kein Einfluss auf die Steroid-Produktion beobachtet werden.

2.4. Wechselwirkung zwischen Digitalis und Mineralokortikoid-Synthese und- Sekretion

Die Produktion des Aldosterons wird durch Digitalis beeinflusst, wahrscheinlich durch seine hemmende Wirkung auf die Na-K-aktivierte Membran-ATPase. Die intrazelluläre K-Konzentration ist nämlich eine wesentliche Regelgröße für die Aldosteron-Synthese (BOYD et al. 1973), über die auch das Angiotensin seine Wirkung entfalten soll (SZALAY 1971). In vivo erfolgt dennoch am Schaf nach einer Latenz von 3o-6o Minuten nach Beendigung einer $1o^{-5}$ molaren Ouabain-Infusion ein deutlicher Abfall der Aldosteron-Sekretion, ohne daß sich die K-Konzentration in den Nebennierenvenen und der adrenale Blutfluss geändert hätte. Dagegen war während der Ouabain-Infusion die Kalium-Konzentration im Serum bei unveränderter Na-Konzentration erhöht und der adrenale Blutfluss vermindert gewesen, die Steroid-Sekretion war nicht verändert (BLAINE et al. 1974). Gleichzeitig wurde, wie oben erwähnt, eine deutlich erhöhte Cor-

tisol- und Corticosteron-Sekretion beobachtet, sodaß ein unspezifisch hemmender Effekt auf die gesamte Nebennierenrinde ausgeschlossen werden konnte. Auch GOMOLL und SHERROD (1964) fanden bei einer Gabe von insgesamt 1.2 mg Acetylstrophanthidin an Hunden einen deutlichen Abfall der Aldosteron-Produktion bei vermindertem adrenalen Blutfluss. Die Plasma-K-Konzentration war gering, jedoch nicht signifikant erhöht. Die Chlorid-Konzentration war erhöht, die Glukokortikoid-Konzentrationen blieben unverändert.

CARPENTER et al. (1962) stellten bei Hunden mit einem durch Rechtsherzfehler hervorgerufenen Hyperaldosteronismus einen Abfall der Aldosteron-Konzentration nach Digitalisierung und einen Wiederanstieg nach erneuter Verstärkung der Rechtsherzbelastung fest. Sie führtendaher die Änderung der Aldosteron-Sekretion auf kardiovaskuläre Faktoren zurück.

Bei in-vitro-Nebennieren-Inkubationen wird ein Absinken der Aldolsteron-Synthese gefunden, sobald Ouabain - auch in geringen Konzentrationen - dem Medium zugesetzt wird. Diesen Befund zeigte CUSHMAN (1969) bei Nebennieren von hypophysektomierten und nephrektomierten Hunden, deren Inkubationsmedium 5.5×10^{-5}M Ouabain enthielt. Gleichzeitig beobachtete er eine verminderte K^{42}-Aufnahme, verminderten K-Gehalt des Gewebes und einen verminderten "netto-K-Austausch". Gleiche Feststellungen machten MARGOULIES et al. (1972) mit einer 10^{-3}-molaren Ouabain-Lösung an Rattennebennieren. Ebenso fanden BOYD et al.(1973) keine Erhöhung der Aldosteron-Synthese trotz Stimulierung mit ACTH oder 3'-5'-cAMP. Dies führten sie auf eine Hemmung der Na-K-Pumpe durch Ouabain zurück, das damit den Anstieg der intrazellulären K-Konzentration trotz Kalium-reichen äußeren Mediums verhinderte. Bei der Dosierung ist offenbar die von AKERA et al. (1969) festgestellten Spezies-spezifische Oua-

bain-Empfindlichkeit der Na-K-aktivierten Membran-ATPase berücksichtigt worden, die eine gute Korrelation zu in-vivo-Befunden (PQ-Zeit) zeigt (Hund > Schwein > Schaf > Meerschwein ≫ Ratte). Diese Synthese-Hemmung scheint nur die zona glomerulosa zu betreffen, da ACTH und 3'-5'-cAMP in Gegenwart von Ouabain nicht die Aldosteron-Synthese anregen können (MULLER 1971), wohl aber die Corticosteron-Synthese (BOYD et al. 1973, BLAINE et al. 1974). Nach CUSHMAN (1969) bleibt auch die 17-OH-Kortikosteroid-Synthese durch Ouabain unbeeinflusst.

Von SZALAY (1971) wird in vitro allerdings eine Steigerung der Aldosteron-Produktion gefunden bei einer Konzentration von 10^{-8}M Ouabain und einer K-Konzentration von 4 und 8 meq/l im Medium. Höhere Ouabain-Konzentrationen hemmen auch hier die Aldosteron-Produktion. Derselbe Autor fand auch, daß nach einer 14-tägigen Vorbehandlung der Ratten mit Ouabain (0.75 mg/kg KGew·die, subcutan) die Aldosteron-Produktion der Nebennieren in vitro stärker war. Er schloss daher auch auf eine vermehrte in vivo-Produktion des Aldosterons, auch deshalb, weil er dazu passende Veränderungen der Elektrolyt-Konzentrationen im Serum festgestellt hatte. Dagegen war bei höheren (1.5 mg/kg·die) und niedrigeren (0.38 mg/kg·die) Dosen kein signifikanter Effekt nachgewiesen worden. Eine ACTH-Wirkung schien unwahrscheinlich,da die Corticosteron-Produktion unverändert blieb. Auch der K-Gehalt der Nebenniere und der Renin-Gehalt der Niere blieben konstant. Allerdings stellten MARGOULIES et al. (1972) und MULLER (1971) auch ohne vorherige Langzeit-Ouabain-Gabe in vivo einen Spontan-Anstieg der Aldosteron-Produktion in vitro fest, die mit dem Wegfall eines in-vivo-existenten Hemmfaktors erklärt wurde .

2.5. Wechselwirkung zwischen Digitalis und Mineralokortikoiden am Zielorgan

Die bei Hypadrenalismus - sei es durch Adrenalektomie oder durch Adrenostatika wie Metopiron - gefundene erhöhte Empfindlichkeit der Versuchstiere auf Digitalis (UNTERMAN et al. 1955, POELDRE und TAESCHLER 1956, GREEFF 1957, SULSER et al. 1959, BORSCH-GALETKE et al. 1972) und Hemmung der Na-K-Pumpe der Rattenblutzellen (SCHATZMANN 1954) lenken die Aufmerksamkeit auf die auf zellulärer Ebene ablaufenden Wechselwirkungen von Digitalis und Kortikosteroiden. Man findet, daß bei Hypadrenalismus die Aktivität der Mg^{++}-abhängigen, Na^{+}-K^{+}-aktivierten ATP-phosphohydrolase (Enzyme Commission No. 3.6.1.3.) in Herz und Nieren vermindert ist (LANDON et al. 1966, JÖRGENSEN 1969, JÖRGENSEN 1972, BORSCH-GALETKE et al. 1972), ein Effekt, der durch Glukokortikoid-Substitution (BORSCH-GALETKE et al. 1972) und durch Aldosteron-oder EDTA-Gaben (LANDON et al. 1966, JÖRGENSEN 1972) reversibel ist. Im aufsteigenden Henle-Schenkel der Nierentubuli hat nur Aldosteron, nicht aber Corticosteron diesen reaktivierenden Effekt auf die ATPase (JÖRGENSEN 1969). Die Aktivitätsverminderung des Enzymes bei Hypadrenalismus beruht eher auf einer Verminderung der Enzymmenge als auf einer Schwächung der molekularen Aktivität (JÖRGENSEN 1972). Es scheinen durch die Verminderung der Membran-ATPase-Aktivität die Zellen sehr anfällig gegenüber weiteren Störungen des intrazellulären Na-K-Gleichgewichtes zu sein, wie es durch Ouabain verursacht wird.

LEFER und SAYERS (1965) wiesen nach, daß am Katzen-Herzmuskel-Präparat der positiv inotrope Effekt von Ouabain sowie die Bradyarrhythmie und der Herzstillstand bei toxischen Dosen dieser Substanz durch Aldosteron (3.3×10^{-8} - 10^{-7} M) inhibiert werden kann.

Dieser Effekt war am stärksten, wenn das Aldosteron 2o Minuten vor dem Ouabain-Zusatz appliziert wurde. Cortisol in einer Konzentration von $1o^{-7}$-$1o^{-5}$ M konnte diesen Ouabain-hemmenden Effekt nicht hervorrufen. RUIZ-TORRES und HÜSTEN (1971) stellten eine kompetitive Hemmung der Digoxin-Aufnahme in die Ascites-Tumor-Zelle durch Aldosteron fest. Auch SULSER et al. (1959) fanden an adrenalektomierten Ratten, daß die durch k-Strophanthosid hervorgerufene Mehrausscheidung von Natrium im Urin bei erniedrigter Natrium-Konzentration im Plasma durch gleichzeitige Gabe von Cortexon vollständig unterdrückt werden konnte. Ähnliche Befunde erhoben auch WILDE und HOWARD (196o) sowie GREENE und WILDE (1962) bei Ouabain. Mit diesen Beobachtungen in Einklang steht der Befund, daß es bei wiederholten Injektionen von Aldosteron zu einer Aktivitätssteigerung der Na-K-aktivierten ATPase im äußeren Nierenmark kommt, was allerdings auch als chronische Adaptation auf die gesteigerte Natrium-Rückresorption gedeutet werden kann (JÖRGENSEN 1972).

LEFER (1966) stellt eine "Anti-Ouabain-Wirkung" der Kortikosteroide auf die Kontraktionskraft von Herzmuskelfasern in vitro fest. Diese verläuft parallel zu ihrer mineralo-kortikoiden Aktivität: Aldosteron ($1o^{-7}$M) und 2α-methyl-9α-flourocortisol hatte den größten Hemmeffekt auf die positiv inotrope Wirkung des Digitalis, während Prednisolon, Cortisol e.a. wirkungslos waren. Einen ähnlichen Antagonismus gegenüber Ouabain zeigte auch das Spironolakton-Derivat CRN (Natrium-Canrenoate), das am in-vitro-Rattenherz den inotropen Effekt von Ouabain aufhob. Dieser Effekt ist offenbar unabhängig von der Wirkung des CRN als Aldosteron-Antagonist, sondern scheint durch eine direkte Wirkung auf die Myokard-Membranen hervorgerufen zu werden (CORABEUF und DEROUBAIX 1974).

Im Widerspruch dazu stehen Befunde von LEVY und RICHARDS (1963), die keinen Antagonismus zwischen Ouabain (1.7×10^{-6}M) und Aldosteron (1.1×10^{-6}- 1.1×10^{-5}M) auf den Kalium-Transport und auf kontraktile und elektrische Eigenschaften des Kaninchen-Herzmuskels feststellen konnten.

3. Material und Methodik

3.1. Tiermaterial, Hypophysektomie

Die Experimente wurden mit männlichen 8o - 1oo g schweren Sprague-Dawley-Ratten (bezogen von der Fa. Großkreutz, Unfinden, BRD) durchgeführt. Die Tiere wurden unter standardisierten Laborbedingungen gehalten (14 Std./die Licht, 22°C) und erhielten Altromin Standard-Diät (Altromin GmbH, Lage/Lippe, BRD). Die Versuche begannen frühestens 36 Stdn.nach der Lieferung. 12 Stdn. vor Beginn der Digitalis-Gaben wurde das Futter entzogen, Wasser ad libitum.

Für die Versuche mit hypophysektomierten Ratten wurde der Stamm CFHB (bezogen von Fa. Carworth, London, GB) benutzt. Die Hypophysektomie erfolgte in Äthertropfnarkose nach der von INGLE und GRIFFITH (1949) beschriebenen Methode: Nach der medianen Hautinzision wurden parapharyngeal die Weichteile des Halses stumpf auseinanderpräpariert. Kurz vor der synchondrosis sphenooccipitalis wurde mit einem langsam rotierenden Zahnbohrer von ca. 2 mm Durchmesser die Schädelbasis durchbohrt, die Dura durchschnitten und die Hypophyse abgesaugt. Der Knochen wurde mit Wachs wieder verschlossen, die Inzision geklammert [1]. Das Gewicht der Tiere wurde in den folgenden 2 Wochen kon-

(1) Für die Durchführung der Operation danken wir Frau Esch (Schering A.G.,Berlin-West).

trolliert und die Testes palpiert, um die Tiere mit evtl. noch aktivem Hypophysengewebe herausnehmen zu können. Die Experimente wurden am 16., 22. bzw. 29. postoperativen Tag durchgeführt. Außer der o.g. Ernährung erhielten die Tiere 5%-ige Glukoselösung um der durch die gestörten Stoffwechselfunktionen auftretenden Hypoglykämie vorzubeugen.

3.2. Angewandte Substanzen, Reinheitsgrad und Applikationsart

3.2.1. Digitalis

Es wurde 12-∝- H^3- Digoxin der Fa. New England Nuclear, GB, hergestellt durch Reduktion von 11-Dihydrodigoxin durch das Na-Salz von Bor-Tritium, mit einer spezifischen Aktivität von 7.81 mCi/mg, verwendet. Das Digoxigenin-H^3 wurde aus dem o.g. 12-∝-Digoxin gewonnen (spez.Aktivität 7.81 mCi/mg).

Die Substanzen wurden jeweils vor den Versuchen auf ihren Reinheitsgrad geprüft: Nach der Trennung auf Dünnschicht-Chromatographie- (DC) -Platten mit Chloroform-Azeton (1:1), 3-fache Entwicklung, und dem Vergleich mit Referenzsubstanzen, wurde mit dem Dünnschicht-Scanner II, Fa. Berthold, ein Radiochromatogramm angefertigt bei gleichzeitiger Integration der Fläche unter den Peaks mit dem Dual Ratemeter-Integrator LB 242K, Fa. Berthold. Der daraus ermittelte Reinheitsgrad lag zwischen 92 und 1oo % der Gesamtaktivität (s. Abb.1), wobei der apparativ-integrativ ermittelte Wert wegen der zu geringen Aktivität nicht immer exakt ermittelt werden konnte, sodaß wir oft das konventionelle planimetrische Verfahren anwandten.

Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels der Originalabfüllungen wurde die Substanz mit 2o% Äthanol in o.9%-iger NaCL-Lösung wieder aufgenommen und o.2 ml

der Ratte bei Kopftieflagerung mit Einstich im rechten Unterbauch intraperitoneal injiziert. Bei den Versuchen für die Erfassung des Umsatzes von Digoxin in der Nebenniere wurden für die bis zu 12 Stdn. dauernden 5-8 µCi, für die bis 96 Stdn. dauernden 2o µCi Digoxin-H^3 appliziert, bei der Fragestellung der Metabolisierung 3o µCi und zur Quantifizierung der Organverteilung 1oo µCi.
Die genaue Bestimmung der Dosis erfolgte durch den Vergleich der Aktivität der Standard-Lösung mit der einer T_2O-Standard-Lösung (Tritiated Water, $2.48 \times 10^6 \pm$ 1% dpm/g am 9. 4. 1973, Fa. Packard).

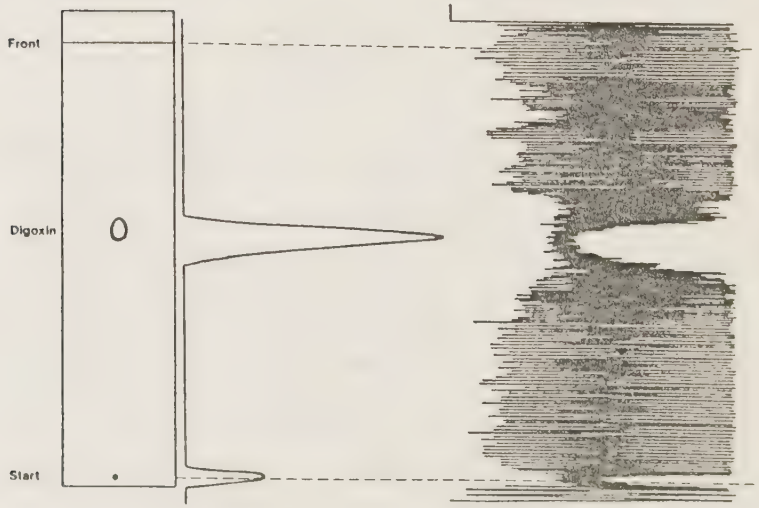

Abb.1: Bestimmung des Reinheitsgrades von Digoxin-H
Dünnschicht-Radiochromatogramm bei gleichzeitiger Integration der Fläche unter den Peaks
(Chloroform-Azeton 1:1, 3-fache Entwicklung)

3.2.2. ACTH

Es wurde ACTH-Trockensubstanz (Schering AG Berlin-Bergkamen, BRD) benutzt, ein hochgereinigtes Präparat, das aus Tierhypophysen gewonnen wird und nach den Richtlinien des III. Internationalen Standards von 1962 standardisiert wird, wonach 1 mg Trockensubstanz 1 I.E. darstellt.

Zur Standardisierung wird u.a. der von SAYERS et al. (1948) entwickelte Ascorbinsäure-Test benutzt, in dem durch Bestimmung des Grades der Verminderung des Ascorbinsäure-Gehaltes der Nebenniere hypophysektomierter Ratten nach ACTH-Gabe dieses quantifiziert werden kann. Man kann also davon ausgehen, daß die Spezies Ratte auf dieses ACTH anspricht. Trotzdem wurde in einem Langzeitversuch die Wirkung von ACTH unterschiedlicher Dosierung auf Gewicht und Morphologie der Nebenniere von uns getestet.
Über 14 Tage wurden täglich 1,1o,1oo,1ooo I.E. ACTH pro kg Körpergewicht in 2 ml o.9%-iger NaCL-Lösung i.p. injiziert. Ein gegenüber der Kontrollgruppe signifikant ($p < 0.05$) größeres Gewicht der der Nebennieren fand sich wegen der geringen Anzahl Tiere pro Gruppe (n=3) und einer starken Streuung der Gewichte erst in der Gruppe, die 1ooo I.E. ACTH/kg KGew täglich erhielt, obgleich in den Mittelwerten der Gewichte eine deutlich steigende Tendenz lag. Histologisch wurde im Vergleich zu der Kontrollgruppe bereits bei den Tieren, die 1o I.E./kg KGew täglich erhielten, ein leicht granuliertes, helleres Zytoplasma im Grenzbereich von zona glomerulosa und zona fasciculata festgestellt sowie eine inkonstante Hyperämie. Die Schichtdicke der einzelnen Zonen ließ sich wegen der vorgenommenen Dekapsulierung nicht genau bestimmen.

Es wurden als sicher wirksame Dosierung 1o I.E. ACTH pro kg KGew. in 2 ml o.9%-iger NaCL-Lösung genommen (zum Vergleich: therapeutische Dosis beim Menschen beträgt 1-2 I.E. ACTH/kg KGew·die). Wegen der sehr kurzen Halbwertszeit des exogenen ACTH von weniger als 5 Minuten wurde diese Dosis im Abstand von 2 Stdn. i.p. injiziert, das erste Mal 3o Minuten vor der Digoxin-H^3-Gabe. In Anbetracht der tageszeitlichen Schwankungen der ACTH-Konzentration im Serum wurden die Versuche jeweils zur gleichen Tageszeit begonnen.

3.2.3. Metyrapon

Diese Substanz hemmt selektiv die Biosynthese von Cortisol, Corticosteron und Aldosteron in der Nebennierenrinde durch Verhinderung der enzymatischen 11-ß-Hydroxylierung am Steroidring. Um unsere Fragestellung unter hoher ACTH-Sekretion zu untersuchen, wurde Metyrapon (Metopiron, CIBA GmbH, CH) in einer Dosierung von 14o mg/kg KGew/die benutzt. Circa 1 ml einer Ölsuspension, entsprechend 7o mg Metyrapon/kg KGew wurden im Abstand von 12 Stdn. 1, 2 und 3 Tage vor der Digoxin-H^3-Gabe oral über eine Schlundsonde appliziert.

3.3. Organgewinnung

Nach dem Töten der Ratte durch Äther wird der Thorax eröffnet, das noch schlagende Herz angeschnitten, das Blut im Reagenzglas aufgefangen und sofort zentrifugiert. Für eine sorgfältige Entblutung durch Kopftieflagerung mit Druck auf das Abdomen und nach der Eröffnung des Abdomens durch Durchtrennung der von der Bauchaorta abgehenden vasa suprarenales media sowie der vasa renales, von denen die aa. suprarenales inf. abgehen, wird Sorge getragen. Die Nebennieren bzw. andere untersuchte Organe wurden herauspräpariert, in o.9%-igem NaCL abgespült und sorgfältig von Fett und Bindegewebe befreit.

3.4. Auflösung der Organe

Die Auflösung der Organe erfolgte 1. in 2o%-iger Zephirol-Dioxan-Lösung mit dem aus Benzalkoniumchlorid gewonnenen Zephirol und 2. in Soluene (Packard Co., Inc., USA), einer starken organischen Lauge (1 ml pro 1oo mg Feuchtgewicht), z.T. unter Rühren oder Schütteln und Erwärmung bis 6o° C für einige Stunden. Eine Zusetzung von Perchlor-

säure und H_2O_2, wie von SEIDEL und VOLF (1972) vorgeschlagen, war wegen des weichen Parenchyms nicht nötig.

3.5. Messung der Radioaktivität

Die Messung der ß-Strahlung erfolgte in den Flüssigkeits-Szintillationsgeräten Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer System, Mod. 2425 (Packard Instrument Co., Inc., USA) und Betaszint, Mod. BF 5ooo, (Beckmann GmbH, BRD), die eine Meßausbeute für H^3 von 54.6 % bzw. 56.7 % hatten. Mit externem Standard wurde jeweils durch Messung und Berechnung des ESKV (Externer Standard Kanal-Verhältnis) die Zählausbeute bestimmt. Ggf. wurde eine Quench-Korrektur durch Zugabe von T_2O als Internem Standard durchgeführt. Von der Zephirol-Dioxan-Organ-Lösung wurde ein Aliquot von o.5 ml mit 2 ml H_2O und 1o mo Dioxan-Szintillator gemessen (Dioxan-Szintillator: 4g 2,5-Diphenyloxazol (PPO), o.o5 g 2,2'-p-Phenylen-bis (4-methyl-5-phenyloxazol) (Dimethyl-POPOP), 12o g Naphthalin, mit Dioxan ad 1 l).
o.5 ml Soluene-Organ-Lösung wurde mit o.1 ml H_2O und 15 ml Toluol-Szintillator (7 g PPO, o.2 g Dimethyl-POPOP, mit Toluol ad 1 l), die Serum-Aktivität mit o.2 ml Serum in 1o ml Instagel-Szintillator (Packard) gemessen.
Zur Messung weitererwässriger Lösungen wurden neben Instagel auch Aquasol-Szintillator (Fa. NEN, GB) und Toluol-BBS3 (4:1) mit BBS3 als Lösungsvermittler benutzt.
Durch chemische Reaktion und Wärme kommt es beim Mischen von Szintillator und Auflösungsmittel zu Chemolumineszenz, die gerade bei der Messung von ß-Strahlung eine falsch positive Aktivität anzeigt. Mit inaktiven Proben zeigte sich, daß nach maximal 2 Std. bei 4^oC diese lichterzeugenden Reaktionen abgeklungen waren.

3.6. Extraktion des Digoxin aus dem Gewebe

Zur Extraktion von Digoxin und seinen nicht-wasserlöslichen Metaboliten wurde nach REPKE (1958) 1oo mg des feuchten Organs mit 1 ml aqua dest. im Potter-Elwin-Homogenisator mit 3oo Upm bzw. im Homogenisator (Fa. Braun BRD) unter Kühlung mit Eiswasser mit ca. 2ooo Upm 1o min. bzw. 5 min. lang homogenisiert, das Homogenat mehrfach mit dem Extraktionsmittel ausgeschüttelt, nach der Zentrifugation (3ooo Upm für 1o min.) das zwischen wässriger und Lösungsmittelphase schwimmende Gewebeplättchen mit einer langen Kanüle durchstochen, um das darunter liegende organische Lösungsmittel abzunehmen, die Mengen zu vereinigen und einzudampfen.

Als Extraktionsmittel wurden die organischen Lösungsmittel Chloroform und Methylenchlorid untersucht. Durch 2-faches Ausschütteln wurden die vorher zugegebenen Mengen Digoxin-H^3 wieder extrahiert. Mit Chloroform bleibt die mittlere Extrahierbarkeit mit 9o.5, 9o.7 und 9o.2 % der zugegebenen Mengen (1,2 und 3 μg dg-H^3) konstant und die Streuung ist gering.

Die Extrahierbarkeit mit Methylchlorid war teilweise besser (91.7, 93.1 und 91.5 % der zugesetzten Mengen), jedoch waren die Schwankungen auch bei 5-fach-Bestimmungen größer, sodaß die Extraktionen mit Chloroform durchgeführt wurden. Das Homogenat wurde 2-fach mit Chloroform ausgeschüttelt, da 3- und 4-faches Ausschütteln keine Vermehrung der Radioaktivität des Extraktes und eine nur noch geringe Abnahme der Aktivität im wässrigen Oberstand (von o.37 % (2-fach) auf o.21 % (4-fach) der Gesamtaktivität) und im Homogenat (von 2.1 % (2-fach) auf o.8 % (3-fach) erbrachten.

3.7. Dünnschicht-Chromatographie

Zur Trennung von Digoxin und seinen Metaboliten von Kortikosteroiden sowie zur Trennung der Digitalisglykoside untereinander wurde die Dünnschicht-Chromatographie (DC) angewandt. Die selbst ausgestrichenen Platten waren mit Kieselgel HF in einer Schichtdecke von o.2 mm für die analytische DC und von o.5 mm für die präparative DC angefertigt und eine Stunde bei 11o^0 C aktiviert. Die eingedampften Extrakte wurden in 5o μl (bzw. 1oo μl für präparative DC) Chloroform-Methanol (1:1) wieder gelöst und in einem Fleck von max. 5 mm Durchmesser aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte bei Kammersättigung mit der Technik der aufsteigenden Entwicklung bis zu einer Höhe von 15 cm.

Es wurden 6 Fließmittel untersucht, die eine unterschiedliche Polarisierung der dem Steroidring anhaftenden Gruppen bewirken. Auch die Häufigkeit der Entwicklung wurde variiert. Als gutes Fließmittel zur Trennung der Digitalis-Glykoside untereinander erwies sich Chloroform-Azeton (1:1), 3-fache Entwicklung (Abb. 2). Die Trennung einiger Glukokortikoide untereinander und von Digoxin und seinen Derivaten war ausreichend mit über Na_2SO_4 getrocknetem Essigsäureäthylester, 2-fache Entwicklung (Abb.3).

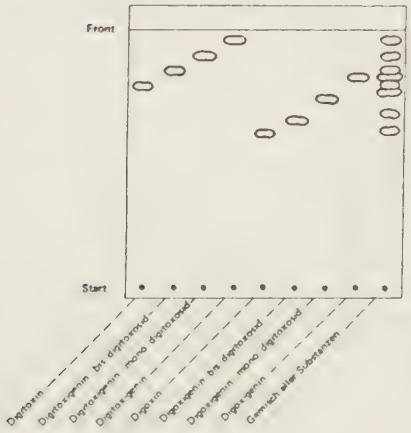

Abb.2: Dünnschichtchromatographische Trennung der herzwirksamen Glykoside mit Chloroform-Azeton (1:1), 3-fache Entwicklung

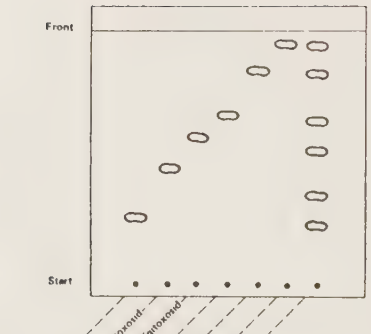

Abb.3: Dünnschichtchromatographische Trennung einiger Glukokortikoide untereinander und von Digoxin und seinen Derivaten mit Essigsäureäthylester, 2-fache Entwicklung

Als Referenzsubstanzen wurden Reinsubstanzen der Fa. Böhringer Mannheim, BRD, benutzt. Zur Lokalisation der inaktiven Substanzen wurde die Platte mit Kaisers Reagenz (Chloramin T in alkoholischer Trichloressigsäure, KAISER 1955) besprüht, 7 min. bei 11o°C getrocknet, nach 3 min. Stehen in gesättigter NH_3-Atmosphäre noch einmal 1o min. bei 11o°C gestrocknet. Die radioaktiv markierten Substanzen wurden mittels DC-Scanner II, Mod. LB 2722 (Fa. Berthold, BRD) lokalisiert, dessen untere Nachweisgrenze bei etwa 2o ooo dpm liegt (Abb.1).

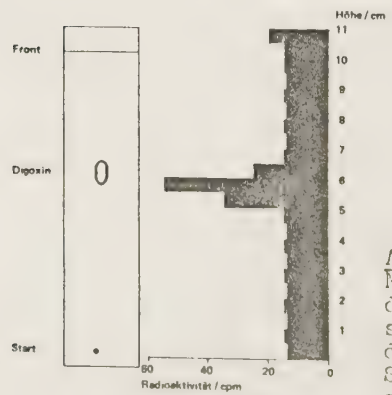

Abb.4: Lokalisation kleiner Mengen von Digoxin-H^3 nach dünnschichtchromatographischer Entwicklung: Messung der Radioaktivität des Sorptionsmittels nach Abschaben von o.5-cm-Portionen

Zum Nachweis sehr kleiner Radioaktivitätsmengen bis minimal 2oo dpm wurde das Sorptionsmittel in Fraktionen von o.5 cm Länge von der Glasplatte abgeschabt und im Flüssigkeits-Szintillator mit 1o ml Toluol-BBS3-Szintillator gemessen (Abb. 4). Unter dem Fluoroskop (Fluotest, Typ 52o1, Quarzlampen GmbH, Hanau, BRD) lassen sich bei einer Wellenlänge von 254 nm gut die Glukokortikoide erkennen, Digoxin und seine Metaboliten aber weder im 254-noch im 36o nm-Bereich.

3.8. Überprüfung von Glykosid-Bestimmungsmethoden

Für den Nachweis von inaktivem Digoxin nach der Extraktion aus der Nebenniere wurden die Xanthydrol-Methode und der Radioimmunoassay auf ihre Anwendbarkeit geprüft.

3.8.1. Xanthydrol-Reaktion

Die Xanthydrol-Reaktion nach PESEZ (1952) erfasst die 6-Desoxyzuckerkomponente im Glykosid mit einer unteren Nachweisgrenze von 1oo ng Digitoxin (REPKE 1958), und ergibt im Gegensatz zu anderen chemisch-kolorimetrischen Methoden - z.B. der Baljet-Reaktion mit Trinitrophenol, die deshalb von uns aufgegeben wurde - nach Ablauf der Reaktion ein stabiles Farbsalz und durch den stärkeren Wechsel der Farbintensität eine steilere Eichkurve.
Die Xanthydrol-Reaktion wurde nach PESEZ (1952) ausgeführt. Die Messung der Extinktion erfolgte im Eppendorf-Photometer (Eppendorf-Gerätebau, Netheler und Hinz GmbH, Hamburg, BRD) mit dem Filter Hg 546 nm und einer 1.o-cm-Küvette. Die Abhängigkeit zwischen Extinktion E ($E = \log \frac{i_o}{i_p}$ mit i_o = Lichtintensität des Null-Wertes, i_p = Lichtintensität der Probe) und der Digoxin-Menge, dargestellt in der Standard-Eichkurve, war bis zu 5o µg Digoxin linear und ergab im Bereich zwischen 1 und 2o µg Digoxin bei guter Reproduzierbarkeit einen Korrelationskoeffizienten von r = o.9969. Bei der Reproduktion betrug die Standardabweichung ± 1 %. Messungen von Mengen kleiner als 1 µg Digoxin sind wegen der zu geringen Auflösung nur sehr ungenau möglich.

Die Messung von steigenden Mengen Digoxin erfolgte nach Extraktion aus 65 mg homogenisiertem Lebergewebe. Vorher wurde das Extrakt über eine Aluminium-hydroxyd-Säule gegeben und das Digoxin mit 2o ml Methanol-Chlo-

roform (1:4) eluiert. Es hatte sich aber gezeigt, daß dieses Reinigungsverfahren mit einem für unser Vorhaben erheblichen Substanzverlust verbunden ist (18.3 ± 5% verbleiben in der Säule). Unter diesen Bedingungen zeigte die Xanthydrol-Methode eine große Streuung, sodaß sie zur Untersuchung unserer Fragestellung nicht geeignet erschien.

3.8.2. Radioimmunoassay

Hierfür wurde der Digoxin Radioimmunoassay Kit der Fa. CIS, (CEA-IRE-Sorin-Association, vertreten durch IDW) benutzt. Er enthält 1. Digoxin-H^3 mit einer aus der Standard-Kurve berechneten spezifischen Aktivität von 6.7 μCi/μg, 2. Digoxin-Antiserum vom Kaninchen, 3. eine Standard-Digoxin-Lösung in Phosphat-Puffer (1o μg/ml), 4. lyophilisiertes Humanserum, 5. Phosphat-Puffer o.o4 M, pH 7.4, unter Zusatz von o.5% eines Bakteriostatikum (BSA), 6. Dextran-Aktivkohle. Die Bestimmungen wurden mit der durch SCHNEIDER (1975) modifizierten Methode durchgeführt.

Der Antiserum-Titer betrug zur Erhöhung der Bindungskapazität 1/45o ooo. Wegen der Verwendung von Chloroform zur Extraktion wurden Glasreagenzgläser benutzt. In diesen wurden die mit dem Vortex-Mixer gemischten Substanzen 1 Std. bei 4°C inkubiert. Mit o.5 ml Dextran-Aktivkohle-Suspension wurde die Reaktion gestoppt, die Kohle durch 1 min. Schütteln mit dem Vortex-Mixer gut vermischt und 3-5 min. nach Zugabe abzentrifugiert (3ooo Upm für 1o min.). o.5 ml des Oberstandes wurden mit 1o ml Instagel-Szintillator im Tri-Carb Spectrometer gemessen. Es wurden 3-fach-Bestimmungen durchgeführt, deren Werte zwischen 2.6 und 3.9 % der mittleren Radioaktivität der Proben schwankten. Die Standardkurve wurde in der linearen Form $M_{dg} = 1ooo \times (cpm_p)^{-1}$ ausgedrückt mit M_{dg} = Menge Digoxin in einer Probe in ng (Abszisse), cpm_p = gemessene Impulse dieser Probe (Ordinate). Nach Berechnung der Regressionsgeraden aus den Standardwerten wurde die unbekannte Menge Digoxin aus den Proben-Impulsen errechnet.

Da die Digoxin-Menge im Nebennieren-Extrakt bestimmt werden sollte und bekannt ist, daß Kortikosteroide und Derivate die radioimmunologische Bestimmung von Digoxin stören (ZEEGERS et al. 1973, CERCEO und ELLOSO 1972), wurden die Digoxin-Standard-Kurven auch mit der einem Paar Nebennieren entsprechenden Menge Nebennieren-Extrakt zusammen inkubiert. Das Lösungsmittel der Referenzproben wurde eingedampft, beim Wiederauflösen durch Aqua-Dest.-Zusatz auf den Salzgehalt der Pufferlösung gebracht. Dem Nebennierenextrakt wurde die Digoxin-Standardlösung zugesetzt und nach oben genannter Methode die Standard-Kurven erstellt und die Regressionsgeraden errechnet. Diese ergaben folgende Gleichungen:

dg-Standard-Kurve: $y = 3.65x + 1.07$, $r = 0.9993$,
mit $y = 1000 \times (cpm)^{-1}$, $x = M_{dg}$,
dg-Standard-Kurve mit Nebennieren-Extrakt:
$y = 3.06\ x + 1.17$, $r = 0.9993$.

Es zeigt sich, wahrscheinlich aufgrund einer Kreuzreaktion, eine gegenüber der Kontrollkurve verminderte Bindungskapazität (36 % gegenüber 43 %) und ein gering höher liegender Nullpunkt als Zeichen einer falsch positiven Reaktion.
Die geringere Steigung, d.h. die vermehrte Bildung eines Antikörper-Digoxin-H^3-Komplexes bei höheren Digoxin-Konzentrationen in Gegenwart der Extrakte ließ sich bisher nicht erklären.

Verschiedene Organextrakte der Ratte wurden auf ihre Kreuzreaktion mit dem Digoxin-Antikörper untersucht. Pro 100 mg Feuchtgewicht zeigten die Extrakte der Nebenniere falsch positive Werte von 0.09 ng dg, gefolgt von denen der Ovarien einer trächtigen Ratte (0.05 ng), des Herzens (0.03 ng), der Leber, des Hirns und der Hoden (je 0.01 ng).

Die o.g. Ergebnisse scheinen es notwendig werden zu lassen, vor der radioimmuologischen Bestimmung des Digoxin aus Nebennieren-Extrakten die störenden Kortikosteroide mittels präparativer Dünnschicht-Chromatographie abzutrennen und erst nach der Elution aus dem Sorptionsmittel den Radioimmunoassay durchzuführen. Der Substanzverlust ist hierbei erheblich und die Schwankungsbreite der Ergebnisse nimmt zu. Dadurch kann der Anteil der Digitalis-Glykoside in der Nebenniere nicht mehr zuverlässig gemessen werden, sodaß wir den Radioimmunoassay für unsere Untersuchung nicht angewandt haben.

3.9. Statistik und Berechnungen

Bei dem geringen Stichprobenumfang sowie unter der Annahme, daß die Stichprobenergebnisse annähernd normal verteilt und die Einzelbeobachtungen unabhängig voneinander erhoben sind, wurde für die Berechnung der Wahrscheinlichkeit von Nullhypothesen die t-Verteilung nach STUDENT zugrunde gelegt (t-Test). Außerdem, unter der Voraussetzung, daß bei den gewählten Körpergewichten der Versuchstiere zwischen 80 und 120 g die Größe des Verteilungsraumes der injizierten Radioaktivitätsdosis diesen Gewichten direkt proportional ist und der Gewebe-Serum-Quotient ((Pharmakon-Menge pro Gramm Feuchtgewebe): (Pharmakon-Menge pro ml Serum)) konzentrationsunabhängig entsteht, wurde die appli-

zierte Dosis (D) auf 100 g Körpergewicht normiert ($D' = \frac{D \cdot 100}{KGew}$) und als Grundlage der kinetischen Berechnungen genommen. Dabei gingen wir davon aus, daß die Elimination des Medikaments aus dem Kompartiment "Nebenniere" abhängig von dessen Konzentration in diesem Organ ist (Reaktion 1. Ordnung), sodaß die logarithmisch-lineare Regressionskurve mit x = Zeit t/h und log y ≒ (% D'/g Feuchtgewicht Nebenniere) bzw. log y = (%D' / ml Serum) nach log y = bx + a berechnet und die Korrelation mit r geprüft wurde. Der statistische Zusammenhang der im Versuch gewonnenen Punkteschar wurde durch die Signifikanz des Korrelations-Quotienten gegen 0 getestet. Anschließend wurde mit der Null-Hypothese H_o: $b_{Ko} = b_{Ve}$ unter Hinzuziehung der t-Verteilung geprüft, ob die durch die spezifische Versuchsanordnung bedingte Kurve sich von der Kontrollkurve unterscheidet.

4. Ergebnisse

4.1. Affinität von Digoxin zur Nebenniere

4.1.1 beim normalen Tier

Die Verteilung von Digoxin-H^3 in den Organen der Ratte nach 24 Stunden post injektionem ist in Abb. 5 dargestellt. Es ist der prozentuale Anteil der auf 100 g Körpergewicht normierten Dosis pro Gramm Organfeuchtgewicht bzw. pro ml Serum angegeben. Die Nebenniere enthält pro Gewichtseinheit die weitaus größte Menge des Digitalis-Glykosids. Die Konzentration ist 31 x so hoch wie im Skelettmuskel und 22 x so hoch wie im Myokard.

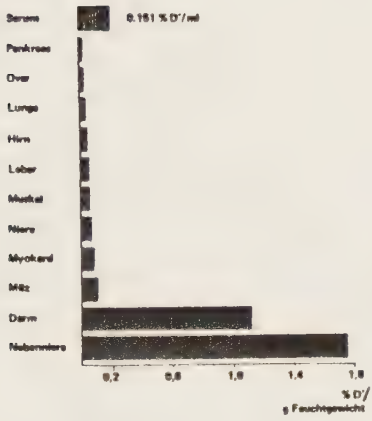

Abb.5: Verteilung von Digoxin-H^3 in den Organen der Ratte 24 Stunden post injectionem. Es ist der prozentuale Anteil der auf 100 g Körpergewicht normierten Dosis pro Gramm Organfeuchtgewicht bzw. pro Milliliter Serum angegeben.

Der zeitliche Verlauf der Digoxin-Konzentration im Serum und in den Nebennieren wird über 96 Stunden verfolgt. Wie man bei der Berechnung des Gewebe-Serum-Quotienten erkennen kann, hat dieser sein Maximum nach 6 Stunden und ab der 3o. Stunde läuft die Konzentration des Digoxin - H^3 in der Nebenniere mit der im Serum parallel (Abb. 6) . Ab diesem Zeitpunkt ist die Halbwertszeit (HWZ) für die langsame Eliminationsphase des Digoxin aus der Nebenniere mit der der Ausscheidung aus dem Organismus identisch. In der Nebenniere

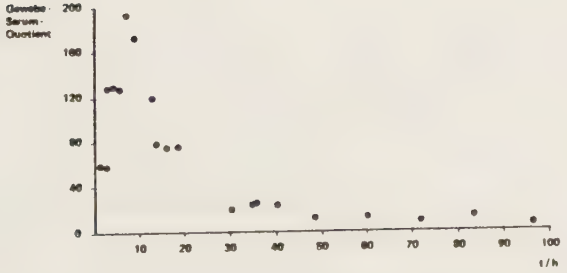

Abb.6: Anreicherung von Digoxin-H^3 in der Nebenniere der normalen Ratte: Verlauf des Gewebe-Serum-Quotienten

ist die Digoxin-Halbwertszeit 19^h19^{min}. Diese Ausscheidung aus dem Organismus wird von einer organspezifischen Eliminationsphase überlagert, deren Halbwertszeit für die Nebenniere 5^h4o^{min} beträgt (Abb.7).

Die Regressionsgeraden nach der allgemeinen Geradengleichung log y = bx + a lauten für die Kurven der langsamen Phase ($t > 3o^h$) log y = o.o156 x+o.2647 (r =-o.9576, HWZ = (-log 2) / b = 19^h19^{min}, n=8, mit x=t/h und y=%D'/g NN, für die Kurve der schnellen Phase, die aus der Differenz zwischen den experimentell erhaltenen und den nach obiger Gleichung berechneten Werten errechnet wird log y = o.o531x + 1.oo5 (r = -o.9287, HWZ = 5^h4o^{min}, n = 12).

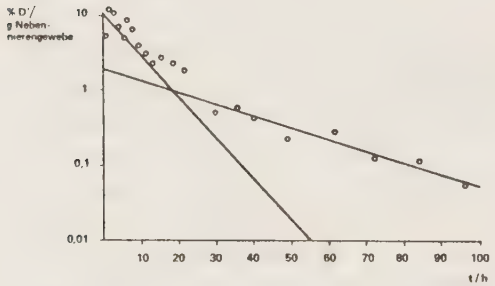

Abb.7: Konzentrationsverlauf des Digoxin-H^3 in der Nebenniere der normalen Ratte: Eine Phase der langsameren Ausscheidung aus dem Organismus (HWZ: 19^h2o^{min}) wird von einer schnelleren organspezifischen Elimination (HWZ: 5^h4o^{min}) überlagert.

Die aus den Serumkurven zu entnehmenden 3 Phasen sind nach DOHERTY et al. (1967) in Abb. 8 dargestellt:

1. die schnelle Phase der Serumverteilung ($t'' \leq 1.5^h$) mit einer HWZ von $2o^{min}$ und der Gleichung log y'' = -o.9o71 x - o.5163 (r'' =-o.9999, n = 2).
2. die mittlere Phase der Gewebeverteilung ($1.5^h \leq t \leq 8^h$) mit einer HWZ von 1^h15^{min} (log y' = -o.239x - o.5573, r' =-o.9681, n = 5),
3. die langsame Phase der Ausscheidung aus dem Organismus ($1o^h \leq t$) mit einer HWZ von $3^d11^h51^{min}$ (log y = -o.oo36x - 1.452, r = - o.7668, n = 13).

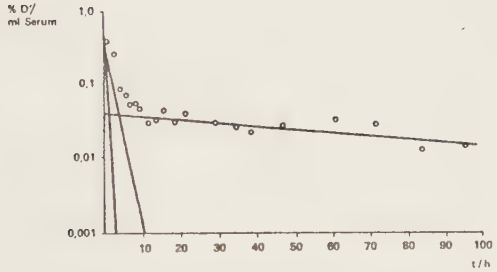

Abb.8: Konzentrationsverlauf des Digoxin-H^3 im Serum der normalen Ratte: Dargestellt sind 1. die schnelle Phase der Serumverteilung (HWZ: $2o^{min}$), 2. die mittlere Phase der Gewebeverteilung (HWZ: 1^h15^{min}) und 3. die langsame Phase der Ausscheidung aus dem Organismus (HWZ: $3^d11^h51^{min}$).

Bei den folgenden Versuchen berechneten wir die Halbwertszeit des Digoxin für die ersten 12 Stunden nach der Applikation. In dieser Zeit findet die größte Anreicherung in der Nebenniere statt.

4.1.2 nach ACTH

Bei gleichzeitiger ACTH-Applikation ist der Abfall der Digoxin-H^3-Konzentration in der Nebenniere stärker als der in der Kontrollgruppe ($2p < o.o5$). Das Digoxin hat in der Nebenniere bei ACTH-Gabe eine Halbwertszeit von 2^h46^{min} im Gegensatz zu 8^ho4^{min} bei der Kontrollgruppe. Auch liegt das Maximum, wie die Extrapolation der Kurve auf den Beginn (t = Ø) zeigt, bei ACTH-Gabe höher (Abb.9).

Die Regressionsgeraden haben folgende Gleichung:
ACTH-Gruppe: $\log y = -o.1o87x + o.8136$
($r = -o.6942$, HWZ = 2^h46^{min}, $n = 24$),
Kontroll-Gruppe: $\log y = -o.o374x + o.6351$
($r = -o.3852$, HWZ = 8^ho4^{min}, $n = 24$).

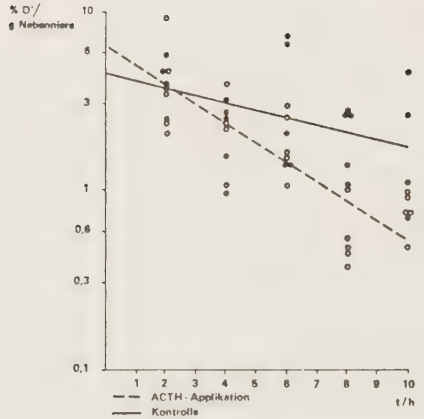

Abb.9: Konzentrationsverlauf des Digoxin-H^3 in der Nebenniere der Ratte mit ACTH-Applikation (1o I.E. /kg KGew., 2stündlich) und ohne ACTH

Der Konzentrationsverlauf des Digoxin im Serum kann bei beiden Gruppen als identisch gelten, die Halbwertszeiten betragen 9^h23^{min} (unter ACTH) und 8^h12^{min} (Kontrollen).

ACTH-Gruppe: log y = -o.o321x + o.884o
(r = - o.5356, HWZ = 9^h23min, n = 24),
Kontrollgruppe: log y = -o.o367x - o.8331
(r = - o.6815, HWZ = 8^h12^{min}, n = 24).

4.2.3. nach Hypophysektomie

Nach Hypophysektomie zeigt sich ein unterschiedlicher Verlauf der Digoxin-Konzentration in der Nebenniere ($2p < o.oo1$) bei hypophysektomierten Tieren ohne und mit ACTH-Substitution. Die HWZen in der Nebenniere betragen mit ACTH-Substitution 1^h49^{min}, ohne Substitution 8^h3o^{min} (Abb.1o).

Die Regressionsgeradengleichungen lauten für die Gruppe mit Hypophysektomie
log y = -o.o354 x + o.712 mit
r = -o.7694, HWZ = 8^h3o^{min}, n = 7,
für die Gruppe mit Hypophysektomie und ACTH-Substitution
log y = -o.166x + 1.257 mit
r = -o.9513, HWZ = 1^h49^{min}, n = 7.

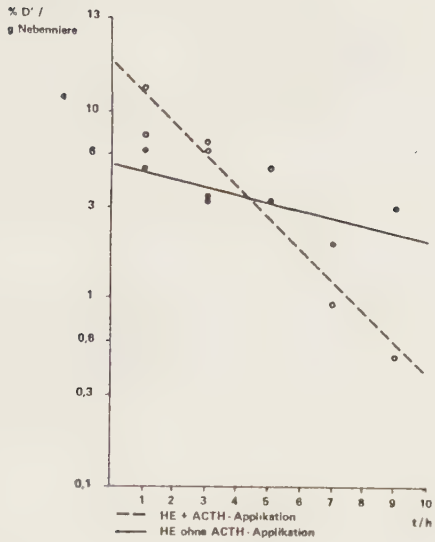

Abb.1o: Konzentrationsverlauf des Digoxin-H³ in der Nebenniere der Ratte nach Hypophysektomie ohne und mit ACTH-Substitution (1ó I.E./kg KGew.,2stündl.)

Auch hier ist der Konzentrationsverlauf im Serum bei beiden Gruppen identisch, jedoch ist die HWZ auffallend kurz: $2^h o8^{min}$ mit sowie $2^h 21^{min}$ ohne Substitution.

Gruppe mit Hypophysektomie:
log y = -o.128x - o.489 mit
r = -o.7759, HWZ = $2^h 21^{min}$, n = 7,
Gruppe mit Hypophysektomie und ACTH-Substitution:
log y = -o.141 x - o.365 mit
r = -o.8494, HWZ = $2^h o8^{min}$, n = 7.

4.2.4 nach Metyrapon

Unter Metyrapon erhalten wir aus den stark gestreuten Einzelergebnissen für die Kontrollgruppe die HWZ_{Ko} = $11^h 58^{min}$, für die Gruppen, die 1, 2 und 3 Tage lang das Adrenostatikum erhielten HWZ_{M1} = $26^h 51^{min}$ resp. HWZ_{M2} = $11^h 59^{min}$ und HWZ_{M3} = $17^h 26^{min}$ (Abb.11). Ein statistisch zu sichernder Unterschied läßt sich nicht feststellen.

Die Regressionsgeraden haben folgende Gleichungen:
Kontroll-Gruppe (Ko) :
log y = -o.o25x + o.796 mit
r = -o.388, HWZ_{Ko} = 11^h58^{min}, n = 13,
Metyrapon-Gruppe (für 1 Tag) (M1):
log y = -o.o112x + o.873 mit
r = -o.342, HWZ_{M1} = 26^h51^{min}, n = 13,
Metyrapon-Gruppe (für 2 Tage) (M2):
log y = -o.o25x + o.793 mit
r = -o.741, HWZ_{M2} = 11^h59^{min}, n = 13,
Metyrapon-Gruppe (für 3 Tage) (M3):
log y = -o.o173x + o.824 mit
r = -o.428, HWZ_{M3} = 17^h26^{min}, n = 13.

Die HWZen im Serum betragen für die Kontroll-Gruppe 7^h32^{min}, für die anderen 4^h46^{min}, 4^h14^{min} sowie 3^h43^{min} und zeigen dabei ebenfalls keinen signifikanten Unterschied.

Die Gleichungen lauten:
Ko : log y = -o.o4o x - o.995
r = -o.6815, HWZ_{Ko} = 7^h32^{min}, n = 13,
M1 : log y = -o.o631 x - o.965,
r = -o.846, HWZ_{M1} = 4^h46^{min}, n = 13,
M2 : log y = -o.o711 x - o.9612,
r = -o.8397, HWZ_{M2} = 4^h14^{min}, n = 13,
M3 : log y = -o.o81 x - o.9136,
r =-o.8557, HWZ_{M3} = 3^h43^{min}, n = 13,

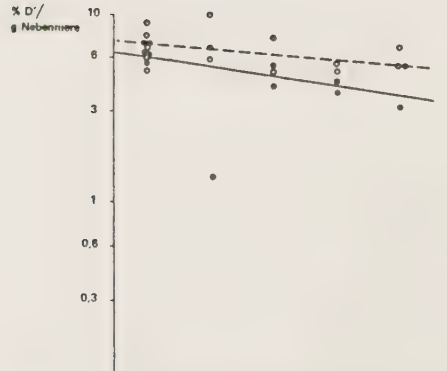

Abb.11: Konzentrationsverlauf des Digoxin-H^3 in der Nebenniere der Ratte nach oraler Metyrapon-Gabe(14o mg/kg KGew./die, 1 Tag)

4.2. Metabolisierung von Digoxin in der Nebenniere

Eine Metabolisierung von Digoxin in der Nebenniere konnte innerhalb der ersten 6 Stunden nach Gabe dieser Substanz auch unter dem trophischen Einfluss von 3 x 1o I.E. ACTH/kg KGew i.p. nicht nachgewiesen werden. Nach der Extraktion der Steroide aus dem Nebennierenhomogenat, das 3 Stunden und 6 Stunden nach der i.p.-Injektion von Digoxin-H^3 gewonnen wurde, und nach der dünnschichtchromatographischen Auftrennung (Chloroform-Azeton (1:1), 3-fache Entwicklung) hatte die radioaktive Substanz den gleichen Rf-Wert wie das zum Vergleich mitentwickelte Digoxin, sodaß eine Identität angenommen werden kann (Abb.12).

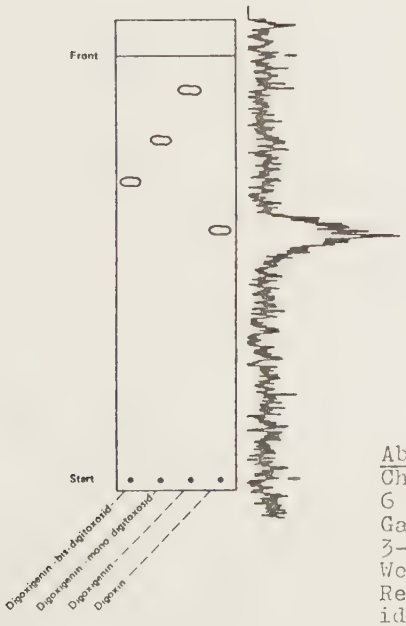

Abb.12: Radiochromatogramm des Chloroform-Nebennieren-Extraktes 6 Stunden nach der Digoxin-H^3-Gabe (Chloroform-Azeton (1:1), 3-fache Entwicklung). Der Rf-Wert des Peaks ist mit dem der Referenz-Substanz Digoxin identisch.

4.3. Affinität von Digoxigenin-H^3 zur Nebenniere

Das Digoxigenin zeigt keine Affinität zur Nebenniere. Der Gewebe-Serum-Quotient hat sein Maximum nach 4 Stunden mit Werten von 3.9 . Die Digoxigenin-Halbwertszeit in der Nebenniere ist relativ kurz (3^h27^{min}), im Serum beträgt sie 36^h25^{min}.

Die Geradengleichungen lauten für Digoxigenin in der Nebenniere:

$\log y = - 0.0873 x - 0.622$ mit
$r = -0.5332$, HWZ = 3^h27^{min}, n = 20,

im Serum:

$\log y = -0.00826 x - 1.445$ mit
$r = -0.3791$, HWZ = 36^h25^{min}, n = 20.

5. Diskussion

24 Stunden nach der intraperitonalen Injektion von Digoxin-H^3 finden wir noch eine sehr starke Anreicherung dieser Substanz in der Nebenniere. Die Konzentration dort ist zu diesem Zeitpunkt 31 mal höher als im Skelettmuskel und 22 mal höher als im Myocard (Abb.5). Für diese Anreicherung scheint der Zuckerrest eine große Rolle zu spielen. Wir fanden nämlich keine Konzentrierung des Aglykons Digoxigenin in der Nebenniere. Die Anreicherung ist auch bei anderen Digitalisglykosiden beobachtet worden. Unmittelbar nach der Injektion wird Digitoxin 29 mal stärker in der Nebenniere als im Skelettmuskel bzw. 7 mal stärker als im Myocard angereichert (REPKE 1958). 18 Stunden p.i. ist es nach CASTLE und LAGE (1973) dort sogar 90 mal stärker als im Myocard konzentriert. Digoxin ist 6 Stunden p.i. in der Nebenniere 15 mal stärker angereichert als in anderen Geweben (DUTTA und MARKS 1966). Auch Ouabain, Lanatosid C und Proscillaridin sollen dort bis zu 20-fach höher konzentriert werden als im Skelettmuskel (BUCHTELA et al. 1970).

Stereoidhormon-artige Nebenwirkungen von Digitalis werden besonders bei Langzeitapplikation gelegentlich beobachtet. So kommt es bei Männern zur Gynäkomastie (LE WINN 1953, RUHRMANN 1955). Bei Frauen in der Postmenopause zeigt sich eine Verminderung der Gonadotropinausschüttung (BURCKHARDT und LA DUE 1968), eine Reifung des vorher atrophischen Vaginalepithels und Veränderungen des Endometriums (SILIQUINI und DURANDO 1954, NAVAB et al. 1965). Als Genese dieser östrogenähnlichen Wirkung käme in Frage eine Verdrängung der Östrogene von ihrer Eiweißbindung oder aber eine Veränderung des Stereoid-Ringes des Digitalis während der Metabolisierung. Durch eine Einführung von Doppelbindungen im Ring A könnte eine östrogenähnliche Substanz entstehen (NAVAB et al. 1965). Diese Beobachtungen führen zu der These, daß auch in der Nebenniere ein metabolischer Um- und Einbau und damit eine Anreicherung zustande kommt, da eine strukturelle Ähnlichkeit über das Cyclopentanoperhydrophenanthrengerüst besteht (DOHERTY et al. 1967, RUIZ-TORRES 197o, CASTLE und LAGE 1973).

Wir untersuchten daher durch dünnschichtchromatographische Auftrennung den Nebennierenextrakt 3 Stunden und 6 Stunden nach der intraperitonealen Gabe von Digoxin-12α-H^3 mit und ohne gleichzeitiger ACTH-Applikation (3 mal 1o I.E. pro Kilogramm Körpergewicht i.p., siehe Abb. 12). Dabei fanden sich keine Digoxinmetaboliten, sondern nur reines Digoxin-H^3.

Mit diesen Ergebnissen stimmen die von CASTLE und LAGE 1973 erhobenen überein, die im Gegensatz zu anderen Organen im Blut und in der Nebenniere keine Digitoxin-Metaboliten fanden. Auch OKITA et al. (1955) und KRAUPP et al. (1968) konnten im Gegensatz zu anderen Organen kein Auftreten von Metaboliten in der Nebenniere nachweisen.

Ein falsch negatives Ergebnis, bei dem sich das Digoxin dem Nachweis durch Radioaktivitätsmessung entzieht, ist unwahrscheinlich, denn ein Syntheseschritt, in dem das 12α-H^3-Atom vom Digoxin abgespalten wird, findet nicht statt. Denn im Zuge der Biosynthese des Cholesterin, aus dem die Nebennierenrindenhormone gebildet werden, wird nämlich bereits in einer frühen Stufe mit der Konversion von Squalen zu Lanosterin eine tetracyclische Ringstruktur gebildet (TCHEN und BLOCH 1957), in der insbesondere das C-Atom 12 bis zum Entstehen der Endprodukte nicht mehr verändert wird.
Zudem stammt gerade bei der Ratte der größte Teil des für die Synthese verwandten Cholesterins aus Leber und Nahrung (VINSON und WHITEHOUSE 1970), und die Leber hat keine besondere Anreicherung der Radioaktivität.

Auch spricht das unmittelbar nach der Injektion von Digitalis nachgewiesene Konzentrationsmaximum in der Nebenniere gegen vorangegangene Stoffwechselschritte.

Die Anreicherung ist auch nicht in anderen stereoidhormonproduzierenden Organen wie Ovar und Hoden nachzuweisen, sodaß die Stereoidbiosynthese nicht die Ursache dafür sein kann.

Reichert sich das Digitalis ebenso wie Aminosäuren mit einem aktiven Transport durch Membranen an? Dieser mit einem Natrium-Transport gekoppelte Aminosäuren-Transport gegen ein Konzentrationsgefälle ist ein energieverbrauchender Prozess. 1965 wurde von CRANE das Modell eines 3-fach-Komplexes von Natrium-Aminosäure-Carrier aufgestellt, der offensichtlich auch einer Sättigungskinetik und kompetitiven Hemmung unterliegt (THIER et al. 1964, REISER und CHRISTIANSEN 1969, HILLMANN und ROSENBERG 1970). Für Energiebereitstellung und damit Umfang des Transportes einer Aminosäuren ist neben bestimmten Cytochrom-Enzymsystemen (KESSLER et al. 1968, KYPSON und HAIT 1971) die Aktivität der Natrium-Kalium-ATPase maßgebend. Der

Transport wird durch Natrium- und Calcium-Zusatz gesteigert, durch Kalium und Ouabain gehemmt (ROBINSON 197o, YOUNG und FREEDMAN 1971, KYPSON und HAIT 1971, ALVARADO und MAHMOOD 1974). Dies Phänomen entspricht der von GREEF 1968 aufgestellten These, wonach ein Anstieg des intrazellulären Kalium-Natrium-Quotienten ein Abfall der intrazellulären Calcium-Konzentration bewirkt und damit eine Minderung der Aktivität der für spezifische Zellleistungen notwendigen ATPase.
Da der Transport einiger Aminosäuren gegen ein Konzentrationsgefälle durch Digitalis gehemmt wird, ist es nicht denkbar, daß eine Digitalis-Anreicherung in der Nebenniere über einen analogen Mechanismus erfolgt.

Auch der hohe Lipoidgehalt der Nebenniere scheint nicht zu einer Anreicherung von Digitalis zu führen. Dieses müßte sich dann in der besonders lipoidreichen zona fasciculata konzentrieren. Nach den audioradiographischen Untersuchungen von BRETSCHNEIDER et al. (1962) ist das Digitalis jedoch mehr in der zona glomerulosa zu finden.

Als ein pharmakologischer Rezptor für Ouabian hat sich die NA-K-ATPase herausgestellt (JÜRGENSEN 1972, ERDMANN und SCHONER 1974, ALLEN et al. 1975). Je nach Herkunftgewebe hat dieses Ferment eine unterschiedliche Affinität zu Ouabian, sodaß mehrere Isoenzyme angenommen werden (AHMED und JUDAH 1964). Auch zwischen einzelnen Spezies besetehen große Unterschiede. Bei der Ratte findet sich die geringste Affinität zu Digitalis (JÜRGENSEN 1972, ERDMANN und SCHONER 1974). Dennoch stellt bei entsprechendem ATPase-Reichtum der Nebenniere dieses Phänomen eine mögliche Erklärung für die Anreicherung dort dar.

Die Durchblutung der Nebenniere könnte zumindest ein fördernder Faktor bei der Anreicherung sein. Nach Ouabain-Gabe wurde nämlich nach dem initialen Absinken des adrenalen Blutflusses eine Stunde später eine Vermehrung um 5o% beobachtet (BLAINE et al. 1974).

Bei kinetischen Untersuchungen der Konzentration von Digoxin in der Nebenniere und im Serum zeigt sich nach der Testung der Signifikanz des Korrelationskoeffizienten ein logarithmisch-linearer Zusammenhang der Punkteschar. Somit kann angenommen werden, daß die Kinetik von Digitalis einer Funktion erster Ordnung folgt, d.h. daß die Elimination dieser Substanz aus einem bestimmten Kompartiment proportional ihrer Konzentration dort ist. Wir gehen also von einer einfachen Diffusion aus, die dem FICK'schen Diffussionsgesetz folgt. Eine geförderte Diffusion oder ein aktiver Transport werden mit diesem Ansatz nicht dargestellt. Wir benutzen für die Rechnungen ein vereinfachtes pharmakokinetisches Grundmodell mit 2 Kompartimenten (Abb. 13, nach GLADTKE und von HATTINGBERG 1973). Aus dem Serum (Cp_1) erfolgt die Aufnahme von Digoxin gemäß der Invasionskonstanten k_{12} in die Nebenniere (Cp_2). Dort wird es in unveränderter Form gespeichert und ebenso wieder gemäß der Eliminationskonstanten k_{20} in den Kreislauf abgegeben. Der Konzentrationsverlauf in dem Kompartiment "Nebenniere" bei gleichzeitiger Invasion und Elimination wird

Abb.13: Vereinfachtes pharmakokinetisches Modell: Aus dem Kompartiment "Serum" (Cp_1) gelangt das Pharmakon entsprechend der Invasions-Konstanten k_{12} in das Kompartiment "Nebenniere" (Cp_2), von wo es entsprechend der Eliminations-Konstanten k_{20} ausgschieden wird.

durch eine nach BATEMAN benannten Funktion beschrieben:

$$y = a \frac{k_{12}}{k_{12}-k_{20}} \times (e^{-k_{2k}t} - e^{-k_{12}t}) \text{ mit } a = \frac{D}{V}$$

, D = applizierte Dosis, V = Verteilungsvolumen, y = Konzentration. Bei dem logarithmisch-linearen Abfall der Bateman-Funktion spielt das Verhältnis Invasionskonstante zu Eliminationskonstante eine bedeutende Rolle. Je mehr sich dieses Verhältnis bei gleichbleibender Elimination zugunsten der Invasionskonstanten k_{12} verschiebt, desto steiler verläuft der absteigende Schenkel der Bateman-Kurve und desto höher liegt eine durch Extrapolation ermittelte imaginäre Anfangskonzentration (Abb. 14). Es läßt sich daraus also nur dann die Größe der Eliminationskonstanten erkennen, wenn diese geschwindigkeitsbestimmend, d.h. wesentlich kleiner ist als die Invasionskonstante.

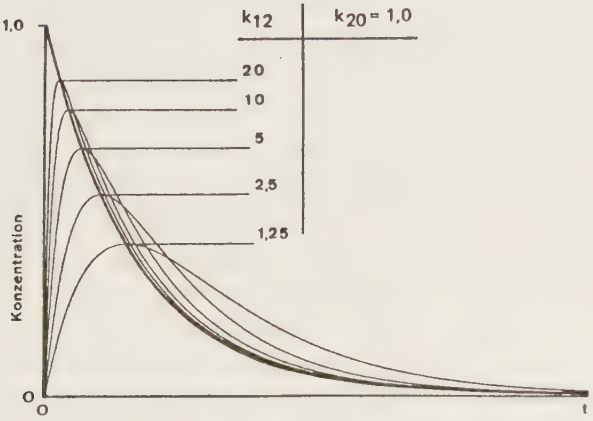

Abb.14: Verlauf der BATEMAN-Funktion bei unterschiedlichem Verhältnis $k_{12} : k_{20}$ (Invasions-Konstante : Eliminations-Konstante)

Der Verlauf der Konzentration des Digoxin-H^3 im Serum und in der Nebenniere ist den Abbildungen 7 und 8 zu entnehmen. Der Verlauf des Gewebe-Serum-Quotienten ist in Abb. 6 dargestellt.

Daß trotz einer i.p.-Injektion dieses Glycosids eine schnelle Invasion in die Blutbahn erfolgt, ist an dem raschen Auftreten des Maximums der Serumkonzentration nach einer halben Stunde zu erkennen, sodaß die intraperitoneale Injektion kinetisch der intravenösen gleichgesetzt wird. Nach DOHERTY et al. (1967) wurde der Konzentrationsverlauf im Serum als eine Oberlagerung dreier Phasen gedeutet: 1. der schnellen Phase der Serumverteilung (HWZ = $2o^{min}$), die angesichts der Applikationsart unter Einbeziehung des Pfortader-Systems und etwas verzögert abläuft, 2. der mittleren Phase der Gewebeverteilung und -rückverteilung (HWZ = 1^h15^{min}) und 3. der langsamen Phase der Ausscheidung und des Abbaus des Pharmakons (HWZ = $3^d11^h51^{min}$). In der Nebenniere werden zwei Phasen unterschieden: 1. eine als organspezifisch interpretierte schnelle Phase (HWZ = 5^h4o^{min}), die sich auf 2. eine langsamere, der Ausscheidung entsprechenden Phase auflagert (HWZ = 19^h2o^{min}). DOHERTY und PERKINS (1966a, DOHERTY et al. 1967) fanden bei einer Beobachtungsdauer von 48 Stunden bei Hunden in den untersuchten Organen Herz, Leber, Niere und Pankreas eine Halbwertszeit von 23 - 26 Stunden. KRAUPP et al. (1968) beobachteten den Verlauf einer α-Acetyl-Digoxin-Konzentration in der Nebenniere nur über 2 Stunden und ermittelten eine Halbwertszeit von 1^h44^{min}. Im Serum fanden sie die sehr kurze Halbwertszeit von 7 Minuten, die auf die schnelle Verteilung im Organismus zurückgeführt wird. Aus den Werte von REPKE (1958) läßt sich bei einer Beobachtungsdauer von 12 Stunden für Digitoxin in der Nebenniere eine Halbwertszeit von 39 Stunden berechnen, im Serum von 9 Stunden 16 Minuten.

Im Laufe der ersten 6 Stunden p.i. wird das Digoxin in der Nebenniere konzentriert. Der Gewebe-Serum-Quotient erreicht sein Maximum mit 192 in der 6. Stunde. Es folgt ein langsamer Abfall, bis ab 3o. Stunde die Konzentration in der Nebenniere mit dem im Serum parallel verläuft (Abb.6).

Die Anreicherung und der Umsatz des Digoxin ist deutlich von der endokrinen Aktivität der Nebenniere beeinflußt. Unter ACTH-Gabe zeigt sich in der Nebenniere trotz stark streuender Einzelergebnisse ein signifikant ($2p<o.o5$) steilerer Abfall der Bateman-Kurve (Abb. 9). Es läßt sich hierbei eine Halbwertszeit von 2^h46^{min} berechnen (Kontrollgruppe: HWZ = 8^h04^{min}). Dies ist der Ausdruck einer schnelleren Elimination. Die durch Extrapolation erhaltene höhere "Anfangskonzentration" des Digoxin deutet zusätzlich an, daß sich das Verhältnis k_{12}: k_{2o} zugunsten k_{12} verschoben hat, wie es in der Abbildung 14 verdeutlicht ist. Es wird also auch die Invasion von Digoxin beschleunigt. Auch der Gewebe-Serum-Quotient zeigt einen schnelleren Anstieg und einen steileren Abfall unter ACTH. Bei den Kontrolltieren läuft die Konzentration von Digoxin in der Nebenniere parallel zu der Konzentration im Serum.

Nach Hypophysektomie ist die Digoxin-Halbwertszeit in der Nebenniere deutlich verlängert ($2p<o.ool$) Abb.1o), d.h. die Elimination verlangsamt. Ohne ACTH-Substitution beträgt sie 8^h3o^{min}, mit ACTH 1^h49^{min}. Auch hier spricht die niedrigere extrapolierte "Anfangskonzentration" bei den hypophysektomierten Tieren ohne ACTH-Substitution für eine Verkleinerung der Konstanten k_{12}, d.h. für eine Verlangsamung auch der Invasion. Die Serum-Halbwertszeiten sind bei beiden Gruppen identisch (2^h21^{min} und 2^h08^{min}) und mit der Halbwertszeit in der Nebenniere der Tiere mit ACTH-Substitution vergleichbar. Für diese Versuche wurde ein anderer Rattenstamm benutzt (siehe 3.1.), worauf offensichtlich die beschleunigte Ausscheidung aus dem Organismus zurückzuführen ist.

Nach Metyrapon-Gabe läßt sich keine statistisch zu sichernde Tendenz feststellen (Abb. 11). Die Halbwertszeit des Digoxin in der Nebenniere beträgt unter Metyrapon $26^{h}51^{min}$, die der Kontrollgruppe $11^{h}58^{min}$. Die Halbwertszeiten im Serum betragen $4^{h}46^{min}$ bzw. $7^{h}32^{min}$. Es ist also die durch die Steroid -Synthese-Blockade bewirkte endogene ACTH-Zufuhr nicht ausreichend, die Digoxin-Aufnahme und -Abgabe zu beeinflussen.

Digoxigenin zeigt keine besondere Affinität zur Nebenniere. Der prozentuale Anteil der Dosis in der Nebenniere liebt beim Digoxigenin 2 Zehnerpotenzen unter dem von Digoxin. Der Gewebe-Serum-Quotient erreicht maximal den Wert 3.9 nach 4 Stunden ,der von Digoxin dagegen zu selben Zeit 13o. Die Halbwertszeit dieser Substanz im Serum beträgt $36^{h}25^{min}$. Aus dem abfallenden Schenkel der Bateman-Kurve für die Konzentration in der Nebenniere errechnet sich die Halbwertszeit $3^{h}27^{min}$.

Es wird also durch die Stimulierung der Nebennierenrindenhormon-Biosynthese mit ACTH eine deutliche Steigerung des Umsatzes des dort angereicherten Digoxin bewirkt. Umgekehrt wird dieser Umsatz durch Hypophysektomie vermindert. Metyrapon hat keinen Einfluß auf den Umsatz.

Nach ACTH findet auch eine Steigerung des Phosphat-Umsatzes, der Cholesterin-Hydrolyse, der Glykogenolyse und der Glukose-Oxydation in der Nebenniere statt (SCHULSTER 1974). Es bleibt daher zu untersuchen, ob es durch Komplex-Bildung mit einer dieser Substanzen zu dem beschleunigten Digoxin-Umsatz kommt, oder ob durch den Abfall des Gehaltes an Ascorbinsäure, Lipiden oder Cholesterin nach ACTH das angereicherte Digoxin ausgeschwemmt wird. Hier spielt die Verstärkung des adrenalen Blutflusses unter ACTH (DOBBIE et al. 1968) zumindest eine fördernde Rolle.

6. Zusammenfassung

Die Nebenniere ist das Organ der Ratte, in dem Digoxin weitaus am stärksten angereichert wird. Dabei wird seine chemische Struktur nicht verändert. Für diesen Vorgang ist offensichtlich der Zuckerrest von Bedeutung, da die Anreicherung bei Digoxigenin nicht beobachtet wird.

Die Kinetik von Digoxin im Serum und in der Nebenniere der normalen Ratte wird dargestellt.

Nach ACTH-Applikation zeigt sich für Digoxin in der Nebenniere eine deutliche Steigerung der Invasion und der Elimination ($2p < 0.05$), nach Hypophysektomie eine deutliche Verminderung ($2p < 0.001$). Metyrapon hat keinen Einfluß auf die Kinetik von Digoxin in der Nebenniere.

Der Mechanismus dieser Anreicherung wird diskutiert. Außerdem werde die Wechselbeziehungen zwischen Digitalis und Nebennierenrinden-Hormonen in der Literatur-Übersicht dargestellt.

7. Literaturverzeichnis

AHMED, K., J.D. JUDAH:
Preparation of lipoproteins containing Cation-dependent ATPase.
Biochim. biophys. Acta 93, 6o3 (1964)

AKERA, T., F.S.LARSEN, T.M. BRODY:
The effect of ouabain on sodium and potassium - activatet Adenosine Triphosphatase from the hearts of several mammalian spezies
J. Pharmacol. exp. Ther. 17o, 17 (1969)

ALLEN, J.C., M.L. ENTMAN, A. SCHWARTZ:
The nature of the transport adenosine-triphosphatase-digitalis complex. VIII. The relationship between in vivo-formed (3-H-ouabain-Na^+, K^+-adenosine triphosphatase) complex and ouabain-induced positive inotropism.
J. Pharmacol. Exp.Ther. 192, 1o5 (1975)

ALVARADO, F., A. MAHMOOD:
Cotransport of organic solutes and sodium ions in the small intestine. A general model. Amino acid Transport.
Biochemistry, 13, 2882 (1974)

BARTOVA, A., M.K. BIRMINGHAM:
Stimulation in vitro of lactic acid production by rodent adrenal glands effects of glucose, ACTH, 3',5'-Cyclic AMP, ouabain, potassium, anaerobiosis and corticosterone.
Endocrinology 88, 845 (1971)

BERNDT, S.: Die Bedeutung der Speicherung von Chlorpherothan (DDT) in der Nebenniere für die Bildung von Corticosteron und Cortisol.
Inang.-Dissertation, Göttingen, (1966)

BLAINE, E.H., J.P. COGHLAN, D.A. DENTON, B.A.SCUGGINS:
In vivo effects of ouabain on aldosterone, corticosterone and cortisol secretion in conscious sheep.
Endocrinology 94, 13o4, (1974)

BORSCH-GALETKE, E., H. DRANSFELD, K. GREEFF:
Specific activity and sensitivity of strophanthin of the na^+, ^+k $^+$- activated ATPase in rats and guinea-pigs with hypoadrenalism.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 274, 74 (1972)

BOYD, J., P.J. MULROW, W.P. PALMORE, P. SILVO:
Importance of potassium in the regulation of aldosterone production.
Circ. Res. 32, Suppl. 1:39. (1973)

BRETSCHNEIDER, H.J., P. DOERING, W. EGER, G. HABERLAND, K. KOCHSIEK, H. MERCKER, F. SCHELER, G. SCHULZE:
Arterielle Konzentration, arterio-venöse Differenz im Coronarblut und Organ-Verteilung von C^{14}-markiertem Lanatosid C nach rascher intravenöser Injektion.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharmak. 244, 117 (1962)

BUCHTELA, K., K. DREXLER, A. FEHRINGER, H. HACKL, M. KÖNIGSTEIN, J. SCHLÄGER:
Vergleichende Untersuchung über Resorption, Verteilung und Ausscheidung einiger Glykoside im Tierversuch.
Wien. Z. Inn.Med. 51, 227 (1970)

BURCKARDT, D., J.S. LA DUE:
Östrogenähnliche Wirkung von Digitalis. (Seine Wirkung auf die Gonadotropinausscheidung bei postklimakterischen Frauen)
Schweiz.med.Wschr. 98, 1250 (1968)

CARPENTER, C.C.J., J.O. DAVIS, Ch.R. WALLACE, W.F.HAMILTON:
Acute effects of cardiac glycosides on aldosterone secretion in dogs with hyperaldosteronism secondary to chronic right heart failure.
Circulation Res. 10, 178 (1962)

CASTLE, M.C., G.L. LAGE: Metabolism and distribution of digitoxin in the rat.
Arch.Int.Pharmacody Ther. 203, 323 (1973)

CERCEO, E., C.A. ELLOSO: Factors affecting the radio-immunoassay of digoxin
Clin.Chem. 18, 539 (1972)

CORABOEUF, E., E. DEROUBAIX: Effect of a spirolactone derivative, sodium canrenoate, on mechanical electrical activities of isolated rat myocardium.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 191, 128 (1974)

CRANE, R.K.: Na^+-dependent transport in the intestine and other animal tissues.
Fed. Proc. 24, 1000 (1965)

CUSHMAN, P.Jr.: Inhibition of aldosterone secretion by ouabain on dog adrenal cortical tissue.
Endocrinology 84, 808 (1969)

DEANE, H.W., L.J. GARDNER:
Ouabain and the adrenal cortex.
Endocrinology 48, 237 (1951)

DENTON, D.A., F.W.KRAINTZ,L. KLRAINTZ: Comm. Behav. biol. 4, 183 (1969), zitiert nach BLAINE et al. (1974)

DOBBIE, J.W., A.M. MACKAY, T. SYMINGTON:
"Memoirs of the society for enclorinology (V.H.T. James and J. Landon (eds.) No. 1, 103, Cambridge University Press, London (1968)

DOHERTY, J.E., W.H. PERKINS: Tissue concentration and turnover of tritiated digoxin in dogs.
Am.J. Cardiol. 17, 47, (1966a)

DOHERTY, J.E., W.H. PERKINS: Digoxin metabolism in hypo- and hyperthyroidsm. Studies with tritiated digoxin in thyroid disease
Ann.Intern.Med. 64, 489 (1966b)

DOHERTY, J.E., W.H. PERKINS, W.J. FLANIGAN:
The distribution and concentration of tritiated digoxin in human tissues
Ann.Intern. Med. 66, 116 (1967)

DOHERTY, J.E.: The clinical pharmacology of digitalis glycosides. A review.
Amer. J. Med. Sci. 255, 382 (1968)

DUTTA, S., B.H. MARKS: Distribution of ouabain and digoxin in the rat and guinea pig.
Life Sci 5, 915 (1966)

ERDMANN, E., W. SCHONER: Korrelation der Bindung von Herzglykosiden an ihren Rezeptor und der Hemmung der ($Na^+ + K^+$)-aktivierbaren ATPase - Klinische Bedeutung und Anwendungsmöglichkeiten.
Verh.Dtsch.Ges.Inn.Med. 8o, 1o75 (1974)

GARDNER, L.I., H. BERMAN, H., W. DEANE:
Metabolic competition between desoxycorticosterone acetate and strophanthin-G in the rat.
Endocrinology 55, 417 (1954)

GLADTKE, E., H.M.v. HATTINGBERG: Pharmakokinetik.
Springer-Verlag, Berlin,Heidelberg,New York (1973)

GOMOLL, A.W., T.R. SHERROD: Influence of acetylstrophanthidin on aldosterone secretion in the intact anesthetized dog.
Arch.int.Pharmacodyn. 15o, 469 (1964)

GOMOLL, A.W.: Influence of ouabain on the formation of corticosterone in the rat adrenal gland.
J. Pharmacol. exp. ther. 156, 3oo (1967)

GREEFF, K.: Mineralstoffwechselwirkungen und Toxizität des Strophanthins bei nebennierenlosen Ratten.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharmak. 231, 391 (1957)

GREEFF, K. :Zum Wirkungsmechanismus der Digitalis-Glykoside. In: Greeff, K. (Hrg.) : Probleme der klinischen Prüfung herzwirksamer Glykoside, Steinkopf, Darmstadt (1968)

GREENE, J.A., W.S. WILDE: Interaction of the effect of aldosterone and ouabain on sodium reabsorption in dog kidney Federation. Proc. 21,431 (1962)

HARTROFT, P.M., A.B. EISENSTEIN: Alteration in the adrenal cortex of the rat induced by sodium deficiency; correlation of histologic changes with steroid hormone secretion. Endocrinology 6o, 641 (1957)

HILLMAN, R.E., L.E. ROSENBERG:
Amino-acid transport by isolated mammalien renal tubules. III. Binding of L-Proline by proximal tubule membranes. Biochim. Biophys. Acta 211, 318 (197o)

HINRICHS, K., H. POPPE, N. STEYER: Verteilung, Resorption und Ausscheidung nach wiederholter oraler Gabe von Conteben. Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharmak. 221, 6 (1954)

INABA, M., K. KAMATA: Effect of ouabain in vivo on corticosterone secretion of rat adrenal gland.
Endocrinology (Jap.), 19, 557 (1972)

INGLE, D.J., J.Q. GRIFFITH: Surgery of the rat.
In: E.J. Farris, J.Q. Griffith (Hrsg.). The rat in laboratory investigation.
J.B. Lippincott Co., Philadelphia, London, Montral (1949)

JÜRGENSEN, P.L.: Regulation of the $(Na^+ + K^+)$-activated ATP-hydrolysing enzyme system in rat kidney. II. The effect of aldosterone on the activity in kidneys of adrenalectomized rats.
Biochim.biophys.Acta 192, 326 (1969)

JÜRGENSEN, P.L.: The role of aldosterone in the regulation of (Na^++ K^+)-ATPase in rat kidney.
J. steroid biochem. 181, (1972)

KAISER, F.: Die papierchromatographische Trennung von Herzgiftglykosiden.
Chem.Ber. 88 , 556 (1955)

KESSLER, R.H., D.LANDWEHR, A.QUINTALA, S.A. WESELEY, W. KAUFMAN, H.ARCILA, B.K. URBAITIS:
Effcts of certain inhibitors on renal sodium reabsoption an ATP specific activity.
Nephron 5, 474 (1968)

KRAUPP, O., G. RABERGER, W. GROSSMANN:
Blut- und Gewebsspiegelkurven sowie renale Ausscheidung von α-Acetyldigoxin bei i.v.-Darreichung am Hund.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak.exper.Path. 26o, 33o (1968)

KYPSON, J., G.HAIT:
The effect of Ouabain, Calcium and Potassium on the transport and incorporation of some amino acids into rabbit atrial tissues in vitro.
Exp. Ther. 177, 388 (1971)

LANDON, E.J., N. JAZAB, L. FORTE:
Aldosterone and sodium-potassium-dependent ATPase activity of rat kidney membranes.
Amer.J.Physiol. 211, 1o5o (1966)

LEFER, A.M., G. SAYERS: Antagonism of the inotropic action of ouabain by aldosterone.
Amer.J.Physiol. 2o8, 649 (1965)

LEFER, A.M.: Corticosteroid antagonism of the positive inotropic effect of ouabain.
J.Pharmacol.exp. Ther. 151, 294 (1966)

LEVY, J.V., V. RICHARDS: Effect of aldosterone on ouabain - induced potassium loss from isolated rabbit atria
Proc.Soc.exp.Biol.N.Y. 114, 28o (1963)

LEWINN, E.B.: Gynecomastia during digitalis therapy.
New Engl. J. Med. 248, 316 (1953)

MARGOULIES, M., M. PALEM-VLIERS, F. FONTAINE:
Study of the kinetics of aldosterone production by rat adrenal glands in vitro. Preliminary report.
Ann.Endocrinol. (Paris), 33, 632, (1972)

METZLER, A. v.: Die Abhängigkeit der Herz- und Nebennierengröße beim Meerschweinchen von Belastung allein und zusätzlicher Digitalisbehandlung.
Zeitschr. f. Kreislaufforschung 38, 341 (1949)

METZLER, A.v.: Über das Zustandekommen der Herz- und Nebennierenvergrößerung und den Einfluss der Nebenniere auf die Herzgröße.
Ärztl. Forschung 6, 424 (1952)

METZLER, A.v., K. GREEFF: Über den Mechanismus der durch K-Strophanthin verursachten Nebennieren- und Herzhypertrophie.
Arch.exper.Path.u.Pharmakol. 222, 352 (1954)

MULLER, J.: Regulation of aldosterone biosynthesis.
Springer-Verlag, New York, 46 (1971)

NAKAGAWA, A., M. WATANABE: Digitaliswirkung auf die Corticosteronbildung in der Nebenniere.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.Exp.Pathol. 254, 355 (1966)

NAVAB, A., L.G. KOSS, J.S. LADUE:
Estrogen-like activity of digitalis.
J.Amer. med. Ass. 194, 3o (1965)

OKITA, G.T., P.J. TALSO, J.H. CURRY, F.D. SMITH, E.M.K. GEILING:
Metabolic fate of radioactive digitoxin in human subjects
J.Pharmacol.exp.Ther. 115, 371 (1955)

OKITA, G.T.: Selected studies on the metabolic-fate of radioactive digitoxin in man. Aus: "Digitalis" by E.Grey Dimond, 57, Springfield (1957)

POELDRE, A., M. TAESCHLER: Der Einfluss von Nebennierenrindenhormonen auf die cardiotone und toxische Wirkung des Lanatosid C.
Helv.physiol. pharmacol.acta 14, C 37 (1956)

PROPPE, D.: Proceedings: On the kinetics of tritiated digoxigenin-monodigitoxoside the guinea-pig.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 282, suppl. R77,22 (1974)

PYÖRÄLÄ, K.: Effect of digitoxin and k-strophantin on the adrenals and testes of the guinea-pig.
Acta Endocrin. (Kbh.) 27, 238 (1958)

REISER, S., P.A.CHRISTIANSEN:
Intestinal transport of amino acids as affected by sugars
Amer. J. Physiol. 216, 915 (1969)

REPKE, K.: Verteilung, Ausscheidung und Stoffwechsel von Digitoxin bei der Ratte.
Arch.exper.Path.u.Pharmakol. 233, 271 (1958)

ROBINSON, J.W.:
The difference in sensitivity to cardiac steroids of $(Na^+ + K^+)$ - stimulated ATPase and amino acid transport in the intestinal mucosa of the rat and other species.
J.Physiol. (Lond.), 206, 41 (1970)

RUHRMANN, H.: Gynaekomastie nach Applikation von Herzglykosiden.
Endokrinologie33, 38 (1955)

RUIZ-TORRES, A.: Kinetik der Herzsteroide im Organismus des Menschen und der Versuchstiere.
Klin.Wschr. 48, 257 (197o)

RUIZ-TORRES,A., J.HOSTEN: Zum Problem der Digoxin-Aufnahme in die Zelle
Arzneimittelforschung (Drug Res.) 21,892 (1971)

SAYERS, M.A., G. SAYERS, L.A. WOOBURY:
The assay of adrenocorticotrophic hormone by the adrenal ascorbic acid-depletion method.
Endocrinology 42, 379 (1948)

SCHATZMANN, H.J.: Die Wirkung von Desoxycorticosteron auf den aktiven Kationenaustausch an Rattenblutzellen.
Experientia (Basel) 1o, 189 (1954)

SCHNEIDER, J.: Digoxin-Blutkonzentrationen zur Beurteilung der klinischenWirksamkeit.
Inaugural-Dissertation, FU Berlin (1975)

SCHULSTER, D.: Adrenocorticotrophic hormone and the control of adrenal corticosteroidogenesis.
Adv.Steroid Biochem.Pharmacol 4, 233 (1974)

SEIDEL, A., V. VOLF: Rapid determination of some transuranium elements in biological material by liquid szintillation counting.
Intern. Journal of Applied Radiation and Isotopes
23, 1 (1972)

SILIQUINI, P.N., DURANDO, C.: Documentazione sperimentale della supposta attivita steroidea dei glucosidi della digitale.
Gazz.med.ital. 113, 1o2 (1954)

SULSER, F., H.A. KUNZ, R. GANTENBEIN, W. WILBRANDT:
Zur Frage der antagonistischen Wirkung zwischen Herzglykosiden und Corticosteroiden auf die Elektrolytausscheidung der Niere.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharmak.235, 4oo (1959)

SZALAY, K.S.: The effect of ouabain on aldosterone production in the rat.
Acta Endocrinol. (KBH), 68, 477 (1971)

TCHEN, T.T., K. BLOCH: On the conversion of squalene to lanosterol in vitro.
J. biol. Chem. 226, 921 (1957)

THIER, S., M.FOX, L.ROSENBERG, S.SEGAL:
Hexose inhibition of amino acid uptake in the rat-kidney-cortex slice.
Biochim.Biophys.Acta 93, 1o6 (1964)

UNTERMAN, D., A.C. de GRAFF, H.S. KUPPERMAN:
Effect of hypoadrenalism and excessive doses of DCA upon response of the rat to ouabain.
Circulat. Res. 3, 28o (1955)

VERNIKOS-DANELLIS, J., B.H. MARKS:
Pituitary inhibitory effects of digitoxin and hydrocortisone.
Proc.Soc.exp. Biol. (N.Y.) 1o9, 1o (1962)

VINSON, G.P., B.J. WHITEHOUSE:
In "Advances in Steroid Biochemistry and Pharmacology (M.H. Briggs, edt.) Vol. 1, 163, Academic Press, London, New York (197o)

WELLEN, J.J., Th.J. BENRAAD: Effect of ouabain on corticosterone biosynthesis and on potassium-and sodium-concentration in calf adrenal tissue in vitro.
Biochem. Biophys.Acta 183, 11o (1969a)

WELLEN, J.J., Th. J. BENRAAD: Effect of ouabain on corticosterone biosynthesis and on intracellular potassium and sodium concentration in adrenal tissue in vitro.
Acta Endocrinol. (suppl.) 138, 5o (1969b)

WELLEN, J.J., Th.J. BENRAAD: Observations on the mechanism of potassium-induced stimulation of corticosteroid biosynthesis in vitro.
Acta Endocrinol (suppl.) (KBH), 155, 112 (1971)

WILDE, W., P. HOWARD:
Renal tubular action of ouabain on sodium and potassium transport during stop flow and slow flow.
J.Pharmacol. Exper. Therap. 13o, 232 (196o)

YUONG, J.A., B.S.FREEDMAN:
Renal tubular transport of amino acids
Clin.Chem. 17, 245 (1971)

ZEEGERS, J.J.W., A.H.J. MAAS, A.F. WILLEBRANDS, H.H. KRUYSWIJK, G. JAMBROES:
The radioimmunoassay of plasmadigoxin.
Clin.Chim. Acta 44, 1o9 (1973)

8. Lebenslauf

16. Feb. 1949	in Berlin geboren als erstes von fünf Kindern des Arztes Dr. Karl Oeff und seiner Ehefrau, der Ärztin Rose Elisabeth, geb. Matthias
Frühj. 1955	Einschulung in die Grundschule in Berlin - Charlottenburg
Frühj. 1959	Umschulung auf das Goethe - Gymnasium, humanistisches Gymnasium in Berlin - Wilmersdorf
März 1968	Abitur am Goethe - Gymnasium
SS 1968 bis SS 1974	Medizin-Studium an der Freien Universität Berlin und - für 4 Semester - an der Universität Zürich, Schweiz
Aug. 1974	Staatsexamen an der Freien Universität Berlin
Sept. 1974 bis Mai 1975	experimentelle Arbeiten an der Dissertation mit der finanziellen Unterstützung nach dem Graduierten - Förderungs - Gesetz
Juni 1975 bis Juli 1976	Medizinalassistentenzeit in Innerer Medizin, Chirurgie und Neurologie
Sept. 1976	Approbation als Arzt